

In-vivo- und In-vitro-Reaktionen auf implantierbare Mikrochips (Transponder) mit unterschiedlichen Oberflächenmaterialien

MIRIAM LINDER

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Manfred Reinacher

**In-vivo- und In-vitro-Reaktionen
auf implantierbare Mikrochips (Transponder)
mit unterschiedlichen Oberflächenmaterialien**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Miriam Linder

Tierärztin aus Frankfurt am Main

Gießen 2006

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

GutachterIn:
Prof. Dr. M. Reinacher
Prof. Dr. S. Kölle

Tag der Disputation: 23. Juni 2006

Tu' das, wovor du Angst hast

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seiten
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	2
2.1 Aufbau und Funktionsweise von Transpondern	2
2.2 Verbreitung und Einsatz von Transpondern	2
2.3 Gründe für die Tieridentifikation	3
2.4 Vor- und Nachteile von Transpondern gegenüber anderen Identifikationssystemen	4
2.5 Migration des Transponders	7
2.5.1 Häufigkeit und Bedeutung der Migration	7
2.5.2 Häufige Migrationsmuster bei Hunden und Katzen	8
2.5.3 Hypothesen zur Ursache der Migration	9
2.5.4 Reaktionen im Gewebe bei Implantation des Transponders	9
2.5.5 Die von Mensch und Tier ausgehenden Migrations-Faktoren im Einzelnen	10
2.5.6 Der Einfluss des Transponders auf die Vorgänge im Gewebe	11
2.5.6.1 Begriff der Biokompatibilität	13
2.5.6.2 Reaktionen im Gewebe im Zusammenhang mit der Migration des Transponders	14
2.5.7 Die Oberflächenmaterialien der Transponder	15
2.5.7.1 Bioglas	16
2.5.7.2 Polypropylen	17
2.5.7.3 Parylene C	18
2.5.7.4 Titan	19
2.5.7.5 Aluminiumoxyd	20

3	Material und Methoden	22
3.1	Transponder	22
3.2	In-vivo-Studie	23
3.2.1	Transponder und Lesegerät	23
3.2.2	Tiere	23
3.2.3	Methoden	24
3.2.3.1	Implantation der Transponder	24
3.2.3.2	Makroskopische Untersuchung	25
3.2.3.3	Entnahme der Transponder und Anfertigung der histologischen Schnitte	25
3.2.3.4	Auswertung der histologischen Befunde	28
3.2.3.5	Kontrollproben	31
3.2.3.6	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von Transpondern der Mäuse	32
3.3	In-vitro-Studie	32
3.3.1	Transponder	32
3.3.2	Zelllinien	32
3.3.3	Kultivierungsbedingungen und Zubehör	32
3.3.4	Methoden	33
3.3.4.1	Ablegen der Transponder in die Zellkulturflaschen und Zugabe der Zellen	33
3.3.4.2	Beurteilung der Zellverbandsdichte und -morphologie im Gewebekulturmikroskop nach Ende der Bebrütung	35
3.3.4.3	Plastikständler aus Polysterol zur mechanischen Fixierung der Transponder	35

3.3.4.4	Entnahme der Transponder aus der Zellkulturflasche, Einsetzen in den Polysterol-Ständer und chemische Fixierung	36
3.3.4.5	Herstellung von Präparaten für das Rasterelektronenmikroskop	38
3.3.4.6	Nicht auswertbare Transponder	40
3.3.4.7	Aufbewahrung der Präparate	40
3.3.4.8	Betrachtung und Auswertung der Präparate im Rasterelektronenmikroskop (REM)	41
3.4	Andere Zellkultur-Untersuchungen mit Transpondern	42
3.4.1	Vorversuch mit den fünf Transpondertypen	42
3.4.2	Zellkultur-Untersuchung mit drei verschiedenen Bioglas-Transpondern	43
4	Ergebnisse	45
4.1	In-vivo-Reaktionen	45
4.1.1	Makroskopische Befunde	45
4.1.2	Anzahl der auswertbaren Präparate	46
4.1.3	Histopathologische Befunde der Kontrollproben	46
4.1.4	Histopathologische Befunde im Gewebe um die Transponder	48
4.1.4.1	Allgemeine Befunde und Gemeinsamkeiten	48
4.1.4.1.1	<i>Bindegewebskapsel</i>	48
4.1.4.1.2	<i>Innere Lage aus Makrophagen</i>	48
4.1.4.1.3	<i>Kapseldicke</i>	50
4.1.4.1.4	<i>Abschnitte mit nicht klassifizierbaren Zellen in der Kapsel</i>	51
4.1.4.1.5	<i>Bindegewebsproliferation im Winkelbereich</i>	51

4.1.4.1.6	<i>Mastzellen und eosinophile Granulozyten in Kapsel und perikapsulärem Gewebe</i>	53
4.1.4.1.7	<i>Entzündungsherde in Dermis und Subkutis</i>	53
4.1.4.2	Materialspezifische Befunde	53
4.1.4.2.1	<i>Bioglas</i>	53
4.1.4.2.2	<i>Polypropylen</i>	56
4.1.4.2.3	<i>Parylene C</i>	59
4.1.4.2.4	<i>Titan</i>	61
4.1.4.2.5	<i>Aluminiumoxyd</i>	64
4.2	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von Transpondern der Mäuse	66
4.3	In-vitro-Reaktionen	67
4.3.1	Nicht auswertbare Transponder	67
4.3.2	Makroskopische Befunde	67
4.3.3	Mikroskopische Befunde	68
4.3.3.1	Kontrolle	68
4.3.3.2	Bioglas	70
4.3.3.3	Polypropylen	72
4.3.3.4	Parylene C	74
4.3.3.5	Titan	77
4.3.3.6	Aluminiumoxyd	80
4.4	Andere Zellkultur-Untersuchungen mit Transpondern	82
4.4.1	Vorversuch mit den fünf Transpondertypen	82
4.4.2	Zellkultur-Untersuchung mit drei verschiedenen Bioglas-Transpondern (Versuch III)	85

5	Diskussion	88
5.1	Bemerkungen zum Aufbau und zur Auswertung der Studie	88
5.1.1	Beurteilung der Wanderung	88
5.1.2	Verwendung von Fibrosarkomzelllinien	88
5.2	Einfluss der In-vivo- und In-vitro-Reaktionen auf die Ortstabilität der Transponder	89
5.3	Histopathologische Befunde der Kontrollproben	92
5.4	Interpretation allgemeiner Befunde und Gemeinsamkeiten	93
5.4.1	Bindegewebskapsel und innere Makrophagenlage	93
5.4.2	Kapseldicke	94
5.4.3	Unterscheidung zwischen komplexen Granulomen und Haargranulomen	95
5.4.4	Abschnitte mit nicht klassifizierbaren Zellen in der Kapsel	96
5.4.5	Bindegewebsproliferation im Winkelbereich	96
5.4.6	Hämosiderin in Kapsel und perikapsulärem Gewebe	97
5.4.7	Mastzellen und eosinophile Granulozyten in Kapsel und perikapsulärem Gewebe	97
5.4.8	Entzündungsherde in Dermis und Subkutis	97
5.5	Interpretation der materialspezifischen Befunde	98
5.5.1	Bioglas	98
5.5.2	Polypropylen	101
5.5.3	Parylene C	104
5.5.4	Titan	105
5.5.5	Aluminiumoxyd	106
5.5.6	Vergleichende Betrachtung der Ergebnisse	108
5.6	Biokompatibilität von Transpondern	109

5.7	Die Bedeutung des Oberflächenmaterials von Transpondern gegenüber anderen ursächlichen Faktoren der Migration	109
5.7.1	Neue Einteilung der Migrationsfaktoren	111
6	Zusammenfassung	113
7	Summary	116
8	Zitate	118
8.1	Literaturverzeichnis	118
8.2	Webseiten	128
9	Anhang	130
9.1	Tabellen zur histopathologischen Untersuchung	130
9.2	Chemikalien, Lösungen, Puffer, Medien	148
9.2.1	Formalin	148
9.2.2	Chemikalien zur Hämatoxylin-Eosin-Färbung	148
9.2.3	Zellkulturmedium	149
9.2.4	Chemikalien zur rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung	150
9.3	Protokoll zur Zellkulturversorgung	151
9.4	Bezugsquellen	153
9.5	Abbildungsverzeichnis	157

Abkürzungsverzeichnis

AL	Aluminiumoxyd
BG	reines Bioglas, Datamars
BG2	reines Bioglas, Planet ID
BGW	Bindegewebe
BSAVA	British Small Animal Veterinary Association
EGR	eosinophile Granulozyten
ETO	Ethylenoxid
EZ	Entzündung
FB	Fibroblasten
FDX	Full Duplex
FECAVA	Federation of European Companion Animal Veterinary Associations
FG	Fettgewebe
FK	Fremdkörper
FS	Fibrosarkomzelllinie
ggr.	geringgradig
GKM	Gewebekulturmikroskop
HDX	Half Duplex
hgr.	hochgradig
ISO	International Organization for Standardization
LZ	Lymphozyten
MØ	Makrophage(n)
mgr.	mittelgradig
min.	minimal
MZ	Mastzellen
NGR	neutrophile Granulozyten
Obj.	Objektivvergrößerung
PA	Parylene C
PP	Polypropylen
PTFE	Polytetrafluorethylen
PZ	Plasmazellen
QM	quergestreifte Muskulatur
REM	Rasterelektronenmikroskop
RFID	Radio Frequency Identity Devices
RZ	Riesenzelle(n)
SI	Silikon
Ti	Titan
TP	Transponder

1 Einleitung

Am Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen wurden im Rahmen einer Bestandskontrolle bei 48 Mäusen (Fa. Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln) eine pathologisch-morphologische sowie eine histologische Untersuchung durchgeführt.

Zur Identifizierung der Tiere waren einige Wochen zuvor standardgemäß Transponder implantiert worden. Es handelte sich um Transponder mit fünf unterschiedlichen Oberflächenmaterialien. Bei der pathologischen Untersuchung wurde festgestellt, dass die entzündlichen Reaktionen im Gewebe in der Umgebung der Transponder je nach Material unterschiedlich waren, und zwar sowohl qualitativ als auch quantitativ.

Der größte Nachteil von implantierbaren Mikrochips (Transpondern) ist ihre gelegentlich auftretende Migration im Gewebe der Tiere. Es wird angenommen, dass mehrere Ursachen für die Migration in Frage kommen. Eigenschaften des Transponders - z.B. das Oberflächenmaterial - gehören dazu.

Ziel dieser Studie war es, die Reaktionen auf Transponder mit unterschiedlichen Oberflächenmaterialien zu untersuchen und zu vergleichen, und zwar sowohl in vivo anhand der zur Untersuchung vorliegenden Mäuse als auch anhand eines sich anschließenden In-vitro-Versuches.

2 Literaturübersicht

2.1 Aufbau und Funktionsweise von Transpondern

Implantierbare Mikrochips zur elektronischen Identifizierung von Tieren – kurz Transponder – gehören zu den so genannten Radio Frequency Identity Devices (RFID); sie bestehen aus einem Mikrochip und einer Antenne, die sich zusammen in einer Bioglaskapsel befinden. Der Mikrochip enthält einen 15-stelligen Code, der weltweit einmalig ist.

Transponder sind zigarrenförmig und können unterschiedlich groß sein, zwischen 12 x 2 mm und 32 x 3 mm.

Der Code kann von einem Lesegerät (Scanner) abgelesen werden, indem es ein niederfrequentes Radiosignal (ca. 134 kHz) aussendet, das ein elektromagnetisches Feld erzeugt. Auf diese Weise erhält der Transponder die Aktivierungsenergie, die erforderlich ist, um seinen Code an das Lesegerät zurückzusenden. Der Code erscheint dann im Display des Lesegerätes. Der Transponder verbraucht außer zum Senden des Signals keine Energie, er benötigt darum keine Batterie und kann theoretisch ein Leben lang halten (FERENCZ, 2005; Webseite Nr. 17, Aufruf Jan/Feb 2006, s. Zitate „8.2. Webseiten“).

Die zum Ablesen erforderliche Distanz zwischen Transponder und Lesegerät darf nicht zu groß sein, sonst kann er nicht erfolgreich aktiviert werden. Je nach Leistung des Lesegeräts ist ein Radius von wenigen bis zu ungefähr 15 cm möglich.

Transponder werden mit Hilfe eines spritzenähnlichen Injektionssystems meist subkutan appliziert, vergleichbar mit einer Arzneimittelinjektion.

2.2 Verbreitung und Einsatz von Transpondern

Die Entwicklung von Transpondern fing Ende der 70er Jahre an. In den 80er Jahren begannen ihre Verbreitung und ihr routinemäßiger Einsatz (OBER, 1998); seit etwa 1990 sind sie als Identifikationssystem fast weltweit etabliert.

Für Fleischfresser (Hunde, Katzen, Frettchen) gilt seit Juli 2004 gemäß der Verordnung (EG) Nr. 998/ 2003 die Pflicht zur elektronischen Kennzeichnung beim Reisen innerhalb der EU.

In Deutschland ist auch bei Pferden – abhängig vom Pferdezuchtverband – die Kennzeichnung mit Transpondern seit mehreren Jahren vorgeschrieben und im Ausland noch stärker verbreitet (FERENCZ, 2005). Ebenfalls ist ihre Verwendung zur Kennzeichnung von Zootieren Routine geworden (BEHLERT und WILLMS, 1992), auch für Labortiere bietet das

System viele Vorteile gegenüber herkömmlichen Identifikationsmethoden (BALL et al., 1991; RAO und EDMONDSON, 1990).

Der Einsatz von Transpondern bei schlachtbaren Nutztieren ist bisher allerdings noch nicht zufriedenstellend, da das Wiederauffinden beim Schlachtvorgang nicht problemlos funktioniert. In einem über vier Jahre dauernden Projekt namens IDEA (Identification électronique des animaux) wurde die Durchführbarkeit einer elektronischen Kennzeichnung von Schlachtvieh untersucht, um sie ggf. innerhalb der Europäischen Union (EU) einzuführen. Es wurden drei elektronische Kennzeichnungssysteme miteinander verglichen: Pansenboli, Ohrmarken und injizierbare Transponder. Im Vergleich zu Pansenboli und Ohrmarken wurde bei den injizierbaren Transpondern eine deutlich geringere Wiederauffind-Rate im Schlachthof verzeichnet. Außerdem konnte die Hälfte dieser Transponder nicht mehr erfolgreich abgelesen werden (RIBÓ et al., 2001; Webseite Nr. 4, Aufruf Jan/Feb 2006, s. Zitate „8.2. Webseiten“).

2.3 Gründe für die Tieridentifikation

Unabhängig von der Tierart ist das Ziel jedes Identifikationssystems das gleiche: die schnelle, problemlose und sichere Identifizierung des einzelnen Tieres. Allerdings sind die Beweggründe unterschiedlich:

- Hunde und Katzen werden gekennzeichnet, um sie schnell identifizieren zu können, falls sie entlaufen und im Tierheim oder bei einem Tierarzt/einer Tierärztin abgegeben werden.
- Die zweifelsfreie Identifikation von Nutztieren dient dem Verbraucherschutz und der Tierseuchenbekämpfung. Weiterhin verbessert sie im internationalen Raum die Überprüfbarkeit von Impf- und Gesundheitsbescheinigungen und dient auf diese Weise auch im Kleintierbereich der Tierseuchenbekämpfung.
- Im Nutztierbereich hilft die (automatisierte) Tieridentifikation ferner, den Betriebsablauf zu optimieren, die artgerechte Tierhaltung zu verbessern und in der Gruppenhaltung eine bedarfsgerechte Einzeltierfütterung zu verwirklichen. Ferner stellt sie auch eine Arbeitserleichterung für den Menschen dar (REISCH, 1992).
- Eine sichere Kennzeichnung beugt auch Diebstahl von Tieren und Betrugsversuchen (z.B. im Tierhandel) vor und erleichtert die Aufklärung dieser Delikte (Webseite Nr. 16, Aufruf Jan/Feb 2006, s. Zitate „8.2. Webseiten“).

- Die sichere Kennzeichnung von Labortieren ist essentiell bei Toxizitäts- und Karzinogenitätsstudien (RAO und EDMONDSON, 1990).
- Bei wertvollen und gefährdeten Tieren (bestimmte Vögel und Reptilien) dient sie dem Artenschutz (KUMMERFELD et al., 2002).

2.4 Vor- und Nachteile von Transpondern gegenüber anderen Identifikationssystemen

Im Vergleich zu anderen Identifikationssystemen bieten Transponder viele Vorteile:

- **Ohrmarken** zur Kennzeichnung von Nutztieren (v.a. Rinder und Schweine) können verloren gehen und sind nicht fälschungssicher. **Halsbänder** mit extrakorporalen Transpondern sind nicht für alle Nutztiere geeignet, vor allem bei Schweinen kann es zu Verlusten kommen. Auch bei Rindern besteht das Risiko des Hängenbleibens (PIRKELMANN et al., 1992).
- **Tätowierungen** bei Hund und Katze haben den Nachteil, dass erstens zum Tätowieren eine Narkose notwendig ist und sie zweitens mit der Zeit verblassen und unleserlich werden können.
- Auch die **Beschreibung äußerer Abzeichen und Kennzeichen** des Pferdes beim Eintragen in den Equidenpass ist nicht so eindeutig wie die elektronische Identifikation.

Allerdings haben Transponder den Nachteil, dass hier die Identifikation nicht - wie zum Beispiel bei einer deutlichen Tätowierung oder der Nummer einer Ohrmarke - auf den ersten Blick möglich ist, sondern dass erst das Scannen erforderlich ist, um den Code lesen zu können. Die Lesegeräte haben einen begrenzten Radius; man muss dem Tier relativ nahe kommen und braucht zum Suchen einen Moment Zeit und Ruhe; das kann bei aggressiven oder ängstlichen Tieren problematisch sein.

Auch ist es bei manchen Tierarten nicht sinnvoll, Transponder anzuwenden: Bei Vögeln muss der Transponder in den Brustmuskel implantiert werden, wofür eine Vollnarkose notwendig ist (KUMMERFELD et al., 2002). Demgegenüber ist die **Beringung** von bestimmten Vogelarten eine allgemein anerkannte und bewährte Kennzeichnungsmethode.

Darüber hinaus gab und gibt es mit Transpondern weitere Probleme.

Bis Mitte der 90er Jahre existierten keine einheitlichen Standards für Transponder. Viele der auf dem Markt vertretenen Modelle hatten unterschiedliche Sendefrequenzen für die Lesegeräte. So gab es Frequenzbereiche von 125 bis 135 kHz, z.T. sogar von 400 kHz (ANONYMUS, 1998). Auch waren die Identifikationssysteme verschiedener Hersteller untereinander inkompatibel (ARTMANN, 1994). So waren z.B. die Lesegeräte oft nur für die Frequenz des eigenen Produkts ausgerichtet, so dass die Lesegeräte des einen Herstellers keine Transponder des anderen erkennen konnten.

Als Lösung wurde Mitte der 90er Jahre eine Standardisierung entwickelt und von der ISO (International Organization for Standardization) als ISO-Normen 11784 und 11785 eingeführt (ARTMANN, 1994). ISO 11784 legt die Struktur des 15stelligen Codes fest, z.B. dass die ersten drei Ziffern für den Hersteller codieren. ISO 11785 beschäftigt sich mit technischen Aspekten der Kommunikation zwischen Lesegerät und Transponder. Sie bestimmt z.B. die Aktivierungs- und Antwortfrequenz und die genaue Interaktion zwischen Lesegerät und Transponder. Es gibt entweder eine Signalübertragung in eine Richtung pro Aktivierungsvorgang (HDX; Half Duplex) oder in beide Richtungen (FDX; Full Duplex).

Außerdem wurde mit ISO 11785 eine Aktivierungsfrequenz von 134,2 kHz festgelegt (ARTMANN, 1994; OBER, 1998; Webseite Nr. 17 Aufruf Jan/Feb 2006, s. Zitate „8.2. Webseiten“).

Durch diese Vorgaben kam es zu einer Vereinheitlichung der Aktivierungsfrequenz und zur Entwicklung von Lesegeräten mit einem breiteren Lesefrequenzbereich. Seitdem haben zum einen alle neuen ISO-Transponder die gleiche Frequenz, zum anderen können bereits implantierte Nicht-ISO-Transponder mit ISO-Scannern abgelesen werden.

Allerdings hat sich dieser Standard noch nicht weltweit durchgesetzt. In den USA haben die verbreitetsten Transponder eine Aktivierungsfrequenz von 125 kHz. Die entsprechenden Lesegeräte erkennen nur diese Frequenzen.

Diese Umstände führten kürzlich zur überflüssigen Euthanasie eines Hundes in einem Tierheim; der Hund besaß einen ISO-Transponder, der nicht von den in den USA üblichen Lesegeräten erkannt wurde, so dass das Tier als herrenlos galt und nach einem Tierheim-Aufenthalt von 10 Tagen euthanasiert wurde (Webseite Nr. 6, Aufruf Jan/Feb 2006, s. Zitate „8.2. Webseiten“).

Ein weiterer Punkt ist die oben schon angesprochene geringe Lesedistanz des Scanners. Abgesehen davon, dass man dem Tier sehr nahe kommen muss, besteht auch der Nachteil, dass die Suche sehr lange dauern kann, wenn die Implantationsstelle nicht bekannt ist. Bei Lebensmittel liefernden Tieren muss zudem die Entnahme des Transponders aus dem Tierkörper am Schlachthof schnell und sicher möglich sein.

Aus diesem Grund wurde in den 90er Jahren eine Vereinheitlichung der Implantationsstellen bei den jeweiligen Tierarten angestrebt, die sich im Großen und Ganzen auch durchgesetzt hat (Webseite Nr. 8, Aufruf Jan/Feb 2006, s. Zitate „8.2. Webseiten“).

So wird bei **Hunden und Katzen** die Mitte der linken Halsseite (Europa) oder die Medianlinie unmittelbar kranial der Schulterblätter (nicht-europäische Länder) empfohlen.

Bei **Pferden** wird entweder das elastische Nackenband im mittleren Drittel des Halses bevorzugt (alle Länder außer Australien) und in Australien die linke Halsmuskulatur.

Schlachtvieh sollte man den Transponder subkutan an der Basis des linken Ohres am Skutulum implantieren.

Als weitere Probleme können Verlust oder Versagen des Transponders auftreten. Beim Implantieren wird der Transponder mit einem Stempel aus der Kanüle ins Gewebe vorgeschoben. Wenn die Kanüle zu früh zurückgezogen wird, kann es passieren, dass der Transponder nicht tief genug subkutan zu liegen kommt und entweder gleich wieder mit herausgezogen wird oder durch den Einstichkanal einige Zeit später wieder herausfällt (PIRKELMANN und KERN, 1994).

Der Transponder kann versagen, z.B. wenn die Ummantelung nicht stabil und dicht genug ist (PIRKELMANN et al., 1992) oder er durch andere mechanische Belastungen beschädigt wird.

Weiterhin kann es zu Entzündungen an der Implantationsstelle und zur Wanderung (Migration) der Transponder unter der Haut kommen.

Außerdem gibt es Berichte von Transponder-induzierten Tumoren bei Mäusen und Ratten (BLANCHARD et al., 1999; ELCOCK et al., 2001; TILLMANN et al., 1997) und einen Fallbericht von einem Transponder-assoziierten Liposarkom beim Hund (VASCELLARI et al., 2004).

Die BSAVA (British Small Animal Veterinary Association) hat in Zusammenarbeit mit der FECAVA (Federation of European Companion Animal Veterinary Associations) 1997 ein Formblatt zur Meldung von unerwünschten Reaktionen in Zusammenhang mit Mikrochips erarbeitet (Webseite Nr. 7, Aufruf Jan/Feb 2006, s. Zitate „8.2. Webseiten“); die „Microchip adverse reactions reporting form“. Es ermöglicht praktischen Tierärzten die Meldung über

unerwünschte Reaktionen im Zusammenhang mit Transpondern. Seitdem werden die eingegangenen Meldungen jährlich von der BSAVA ausgewertet. Auffallend bei diesen Auswertungen ist erstens, dass im Verhältnis zur geschätzten derzeit implantierten Transponderzahl die Meldungen an unerwünschten Reaktionen sehr gering sind (SWIFT, 2000), und zweitens, dass die Migration des Transponders die häufigste Meldung ist (SWIFT, 2000, 2002, 2004; Webseite Nr. 9, Aufruf Jan/Feb 2006, s. Zitate „8.2. Webseiten“).

2.5 Migration des Transponders

Als Migration oder Wanderung wird die Positionsveränderung des Transponders von der Implantationsstelle an eine andere Stelle bezeichnet. PIRKELMANN und KERN (1994) definieren als Wanderung die Lageveränderung von mindestens 3 cm von der Ursprungslage. In ihrer Veröffentlichung beziehen sie sich auf Rinder.

2.5.1 Häufigkeit und Bedeutung der Migration

Nicht jeder implantierte Transponder wandert; es wurden in der Vergangenheit nur relativ wenige Fälle über die „Microchip adverse reactions reporting form“ gemeldet (SWIFT, 2000). Auch liegen Studien vor, in denen überhaupt keine Migration der Transponder beobachtet wurde (GABEL et al., 1988; KONERMANN, 1994; MURASUGI et al., 2003).

Soweit bekannt ist, stellt das Phänomen Migration keine gesundheitliche Gefahr für das Tier dar. Die Migration ist dennoch aus verschiedenen Gründen unerwünscht:

- Bei Schlachtvieh ist es unerlässlich, den Transponder beim Schlachtvorgang schnell und sicher zu finden und zu entfernen, nicht nur zur Identifizierung des Tieres, sondern auch aus lebensmittelhygienischen Gründen (NIND, 1999; PIRKELMANN und KERN, 1994).
- Bei Hunden und Katzen besteht die Gefahr, dass ein gewanderter Transponder beim Scannen nicht wieder gefunden wird. Es ist vorstellbar, dass ein Tier dann unnötigerweise noch einen Transponder implantiert bekommt oder – im schlimmsten Fall – als herrenlos gilt und im Tierheim nach Ablauf einer bestimmten Frist euthanasiert wird (Webseite Nr. 6, Aufruf Jan/Feb 2006, s. Zitate „8.2. Webseiten“).

- Weiterhin kann der Transponder an Stellen wandern, die einer erhöhten mechanischen Belastung ausgesetzt sind (z.B. Ellenbogen) und dort leichter zerstört werden.

Letztendlich spielt auch die Akzeptanz der Tierbesitzer eine Rolle. Trotz all der Vorteile, die das Identifikationssystem mit sich bringt, mag die Vorstellung, dass der Transponder als Fremdkörper im Körper des eigenen Tieres umherwandern könnte, bei vielen Menschen eine ablehnende Haltung gegenüber diesem System auslösen.

Ein mit implantierbaren Transpondern vergleichbares Implantat in der Humanmedizin ist das stäbchenförmige, ca. streichholzgroße Kontrazeptivum Implanon[®]. Es wird in den Oberarm implantiert und gibt kontinuierlich kleine Mengen Hormone an den Körper ab.

Auch hier gibt es Fallberichte von der Migration des Stäbchens, die eine Entnahme erschwert, wenn die Patientin die Schwangerschaftsverhütung nicht mehr wünscht (EVANS et al., 2005).

Wie oben bereits erwähnt, kann eine geringe Wanderung des Transponders toleriert werden (PIRKELMANN und KERN, 1994), und auch SWIFT (2004) sagt, etwas Bewegung des Transponders könne in den ersten paar Wochen nach der Implantation erwartet werden.

Die Migration wird dann zur unerwünschten Reaktion, wenn sie über ein Toleranzmaß hinausgeht.

2.5.2 Häufige Migrationsmuster bei Hunden und Katzen

BURK und EICH (1995) berichteten von einem Fall, bei dem der Transponder eines Basset Hounds von der Implantationsstelle zwischen den Schulterblättern zum linken Ellenbogen gewandert war.

SWIFT (2000, 2002) stellt in der Auswertung der „Microchip adverse reactions reporting form“ ebenfalls fest, dass häufige Stellen, an die der Transponder bei Hunden und Katzen wandert, Schulter, Ellenbogen und Brustbein sind, wobei die ursprüngliche Implantationsstelle nicht angegeben wird.

2.5.3 Hypothesen zur Ursache der Migration

In der Literatur werden mehrere Faktoren als Ursachen für die Migration genannt. Sie lassen sich einteilen in Faktoren, die ausgehen vom

1. Tier:

Alter, Anatomie, Bewegung/Unruhe beim Implantieren (LAMMERS et al., 1995; PIRKELMANN und KERN, 1994)

2. Mensch:

Wahl der Implantationsstelle (physiologische Beweglichkeit und anatomische Besonderheiten), Injektionstechnik und -erfahrung, äußere Krafteinwirkung, Palpation des Transponders nach dem Implantieren, (BUTCHER, 1998; GRUYS et al., 1993; JANSEN et al., 1999; PIRKELMANN und KERN, 1994)

3. Transponder:

Form, Größe, Oberflächenbeschaffenheit, Oberflächenmaterial (PIRKELMANN und KERN, 1994)

2.5.4 Reaktionen im Gewebe bei Implantation des Transponders

Bevor die einzelnen Migrations-Faktoren näher besprochen werden, soll kurz auf die physiologischen und pathologischen Reaktionen eingegangen werden, die sich bei und infolge der Implantation im Gewebe abspielen.

Durch die Kanüle und das Vorschieben des Transponders unter die Haut entstehen kleine Läsionen im Gewebe, es kommt zu Blutungen (MADER et al., 2002). Im weiteren Verlauf setzen die physiologischen Wundheilungsvorgänge ein: Resorption und Phagozytose von zerstörtem Gewebe sowie Reparation des Defektes durch die Ausbildung eines Granulationsgewebes. In bisherigen Studien wurden Exsudat, Zelldetritus, neutrophile Granulozyten, Makrophagen und eine beginnende Proliferation von Fibroblasten und Gefäßsprossung in den ersten Tagen und Wochen nach Implantation gefunden (GRUYS et al., 1993; LAMMERS et al., 1995; MURASUGI et al., 2003).

Die komplikationslose Wundheilung ist nach allgemeiner Ansicht (KUMAR et al., 2005) nach ca. 30 Tagen abgeschlossen.

Zusätzlich zur normalen Wundheilung kommt beim Transponder noch die Fremdkörper-Reaktion hinzu. Sie führt zur Ausbildung einer dünnen, bindegewebigen Kapsel um den Transponder, die gelegentlich von einer geringgradigen Entzündungszellinfiltration umgeben ist (BALL et al., 1991; GEISEL et al., 1998; GRUYS et al., 1993; JANSEN et al., 1999; MADER et al., 2002; MURASUGI et al., 2003; RAO und EDMONDSON, 1990).

2.5.5 Die von Mensch und Tier ausgehenden Migrations-Faktoren im Einzelnen

Injektionstechnik und -erfahrung

Es ist von Bedeutung, ob die injizierende Person bei der Implantation zusätzlich zu den unvermeidlichen Mikrotraumata noch größere Läsionen setzt. Das verzögert nämlich zum einen die Wundheilung, zum anderen herrscht am Implantationsort anfangs eine noch größere Beweglichkeit des Transponders.

Ähnliches gilt auch für Unruhe und Bewegung des Tieres beim Implantationsvorgang.

Alter des Tieres

Dieser Faktor bezieht sich auf die physiologische Beweglichkeit im Gewebe. Bei Jungtieren ist sie durch das Wachstum größer als bei Adulten. Rassespezifische Besonderheiten, also anatomische Gegebenheiten, beeinflussen ebenfalls die Beweglichkeit im Gewebe; beim schlanken Whippet z.B. wird sie vermutlich anders sein als bei einem Berner Sennenhund von normaler Statur.

Angesichts dieser Umstände wurde bei der Vereinheitlichung der Implantationsstellen darauf geachtet, Stellen auszuwählen, an denen möglichst wenig physiologische Beweglichkeit existiert, was auch die Nähe zu Knochenvorsprüngen einschließt.

Die Palpation des Transponders unter der Haut durch den Menschen sowie andere äußere Krafteinwirkungen können wiederum zu Mikrotraumata führen und einen neuen Wundheilungsprozess in Gang setzen.

2.5.6 Der Einfluss des Transponders auf die Vorgänge im Gewebe

Eben wurden die Faktoren näher beleuchtet, die Mensch und Tier zur Migration des Transponders beitragen können. An dieser Stelle soll nun näher darauf eingegangen werden, wie in der Literatur der Zusammenhang zwischen den verschiedenen Eigenschaften des Transponders und ihrem Einfluss auf die Vorgänge im Gewebe beschrieben wird.

Zu den Vorgängen zählt nicht nur die Migration, in der Literatur wird auch die grundsätzliche Gewebeverträglichkeit des Transponders als Langzeitimplantat diskutiert. An dieser Stelle sei erwähnt, dass die im Folgenden besprochenen Eigenschaften selbstverständlich auch in der Humanmedizin Einfluss auf die Gewebeverträglichkeit von Implantaten haben (REULING et al., 1991).

a) Form des Transponders

Gemäß JANSEN et al. (1999) trägt die abgerundete, zylindrische Form der Transponder zur erwünschten Gewebereaktion bei.

Die Zylinder- oder Zigarrenform der Transponder lässt sich ohnehin wenig modifizieren, da zum einen Mikrochip und Antenne in der Glaskapsel Platz haben müssen, zum anderen der Transponder in eine Kanüle passen soll, damit die schnelle und narkosefreie Applikation möglich ist (HÜTHER, 2005).

b) Größe des Transponders

Laut BEHLERT und WILLMS (1992) ist die Gewebeverträglichkeit bei kleinen Transpondern besser als bei größeren. In einer anderen Studie wanderten bei jüngeren Tieren größere Transponder mehr als kleinere Transponder, während sich bei älteren Tieren eine geringere Wanderung zeigte; die Autoren schlossen daraus, dass die Ortstabilität bei den größeren Transpondern mit dem Tialter zunimmt (PIRKELMANN und KERN, 1994).

c) Oberflächenbeschaffenheit des Transponders

PIRKELMANN und KERN (1994) fanden, dass Transponder mit einer glatten, unbehandelten Glas-Oberfläche stärker wanderten als Transponder, die mit PTFE (Polytetrafluorethylen) beschichtet waren; hier kann zusätzlich das Oberflächenmaterial eine Rolle gespielt haben.

JANSEN et al. (1999) fanden insgesamt keine Unterschiede in der Gewebsreaktion und im Grad der Migration zwischen Transpondern mit glatter bzw. aufgerauter Bioglas-

Oberfläche sowie Transpondern mit Polypropylenkappe. In einer anderen Studie wurde eine stärkere Reaktion um die Polypropylenkappe gefunden, verglichen mit den Reaktionen um den Glasteil der Transponder; es fanden sich minimal bis geringgradig Entzündungszellen und teilweise auch granulomatöse Entzündungsreaktionen (RAO und EDMONDSON, 1990).

d) Oberflächenmaterial des Transponders

OBER (1998) gibt einen ausführlichen Überblick über die Entwicklung der Beschichtungsmaterialien von Transpondern: Zunächst wurden Plastik- und Kunststoffumhüllungen verwendet, die sich allerdings als nicht stabil und dicht genug erwiesen und zu Funktionsausfällen der Transponder führten. Polyethylen führte in einigen Studien zu chronischen Entzündungsreaktionen und Abszessen.

Als bislang am besten verträglich erwies sich inertes Glas, da es sowohl eine gute Gewebeverträglichkeit als auch eine langfristig gute chemische Stabilität und Unlöslichkeit im Organismus aufweist.

Im Bezug auf das Wanderungsverhalten fanden – wie bereits oben erwähnt - PIRKELMANN und KERN (1994) bei Transpondern mit PTFE-Beschichtungen (Polytetrafluorethylen) eine deutlich höhere Ortstabilität als bei glatten, unbehandelten Glastranspondern. Die Autoren meinen, die als „physiologisch verträglich“ bezeichneten Materialien ermöglichten ein intensiveres Einwachsen des Transponders in die Umgebung.

Auch Polyethylen als Oberfläche soll einer Migration entgegenwirken (GEISEL et al., 1998). MADER et al. (2002) bezeichnen Polyethylen und Polytetrafluorethylen als Antimigrationshülsen. Allerdings zeigte sich bei GEISEL et al. (1998) eine chronische Entzündungsreaktion auf Polytetrafluorethylen, und OBER (1998) führt – wie bereits erwähnt – Studien an, in denen Polyethylen zu Abszessen führte.

Die Firma Destron Fearing (heute Digital Angel Corporation, South St. Paul, USA) reagierte auf das Problem der Migration, indem sie Bioglas-Transponder mit einer sogenannten Antimigrationskappe aus Polypropylen ergänzten, die seit Ende der 80er Jahre auf dem Markt ist.

ARNDT und WIEDEMANN (1991) geben eine Übersicht über Feld- und Praxiserfahrungen mit Transpondern, die diese Antimigrationskappe besitzen. In den meisten vorgestellten

Untersuchungen war keine Wanderung der Transponder zu beobachten, und die Gewebeverträglichkeit war generell gut.

In anderen Studien wird berichtet, dass Gewebe in die Spalten zwischen Polypropylenkappe und Bioglas eingewachsen war (JANSEN et al., 1999); es wurde die Vermutung geäußert, dass dadurch der Transponder besser im Gewebe verankert wird und nicht wandert (MURASUGI et al., 2003; RAO und EDMONDSON, 1990). Bei diesen Überlegungen spielt offensichtlich auch die besondere Struktur der Kappe eine Rolle.

Allerdings stellten JANSEN et al. (1999) in ihrer Studie eine Wanderung aller untersuchten Transponder fest, darunter auch solche der Firma Destron Fearing. RAO und EDMONDSON (1990) sagen, der Sinn der Kappe sei es, eine milde Gewebsreaktion hervorzurufen und den Transponder an der Implantationsstelle zu immobilisieren.

Die Firma Pet ID (Pet-ID UK Limited, Hurstpierpoint, West Sussex, Großbritannien) verwendet für ihre Transponder eine Beschichtung mit Parylene C, um eine bessere Gewebe-Bindung zu bewirken und so der Wanderung vorzubeugen (FRY und GREEN, 1999; Webseite Nr. 15, Aufruf Jan/Feb 2006, s. Zitate „8.2. Webseiten“).

Die derzeit erhältlichen und verwendeten Transponder bestehen alle aus einer Bioglaskapsel, die ggf. mit einem zusätzlichen Material beschichtet ist.

2.5.6.1 Begriff der Biokompatibilität

Der Begriff Biokompatibilität wird häufig im Zusammenhang mit Transpondern und Implantaten genannt. Aus diesem Grund soll hier kurz darauf eingegangen werden.

Biokompatibilität ist definiert als die Fähigkeit eines Materials, bei einem spezifischen Einsatz den Anspruch auf eine angemessene Reaktion des Körpers zu erfüllen (WILLIAMS, 1999).

Dabei werden eine bindegewebige Einkapselung des Implantats und eine geringe Makrophagen- bzw. Riesenzellaktivität noch als normal bzw. angemessen angesehen, zumal diese Reaktion von nahezu allen Biomaterialien hervorgerufen wird (RATNER, 2002; Webseite Nr. 14, Aufruf Jan/Feb 2006, s. Zitate „8.2. Webseiten“).

Allerdings beschränkt diese Einkapselung viele Einsatzmöglichkeiten von Implantaten. RATNER (2002) zählt einige Beispiele auf: Z.B. ist bei Implantaten, die kontinuierlich Arzneimittel an den Körper abgeben sollen, durch die mangelnde Gefäßversorgung der

Bindegewebskapsel auch die gewünschte Arzneimittelfreisetzung beeinträchtigt. Durch die Bindegewebskapsel wird außerdem eine völlige Integration des Implantats in das umliegende Gewebe verhindert, z.B. bei Brustimplantaten.

Die bindegewebige Einkapselung wird als letzter Schritt in der Fremdkörper-Reaktion gesehen. Sie beginnt damit, dass sich Proteine aus der umgebenden extrazellulären Flüssigkeit an die Oberfläche des frisch eingesetzten Implantats anlagern. Die Proteinadsorption ist unspezifisch, d.h. weder die Art der Proteine noch deren Anordnung auf der Implantatoberfläche sind vorhersehbar. Diese Lage aus unspezifischen Proteinen scheint der Organismus als nicht-physiologisch anzusehen, sie führt zur Aktivierung von Immunzellen und leitet auf diese Weise die Fremdkörper-Reaktion ein. Die heutige Implantatforschung konzentriert sich deswegen darauf, die Oberflächen von Implantaten so zu modifizieren, dass eine unspezifische Proteinadsorption verhindert wird. Gleichzeitig sollen die Oberflächen so gestaltet werden, dass die Entzündungsreaktion des Körpers auf das Implantat gesteuert werden kann, damit es regelrecht als körpereigen akzeptiert wird und ohne Fremdkörper-Reaktion einwächst (RATNER, 2002; Webseite Nr. 14, Aufruf Jan/Feb 2006, s. Zitate „8.2. Webseiten“).

2.5.6.2 Reaktionen im Gewebe im Zusammenhang mit der Migration des Transponders

Bisher wurde ein Literaturüberblick über den Einfluss von Transponder-Eigenschaften auf die Vorgänge im Gewebe gegeben.

Nun soll erörtert werden, wie in der Literatur folgende Fragen diskutiert werden:

1. Welche Gewebsreaktionen sind verantwortlich für die Migration?
2. Welche Gewebsreaktionen sind wünschenswert, um die Migration zu reduzieren oder zu verhindern?

Zur Frage, wie und welche Reaktionen im Gewebe mit der Wanderung der Transponder zusammenhängen, wird in der Literatur wenig gesagt. JANSEN et al. (1999) meinen, die Körperbewegung des Tieres könne die Gewebebrücken zwischen Transponder und dem umliegenden Gewebe brechen, so dass wieder Mikrotraumata entstehen, die erneut in ein Granulationsgewebe münden; die an der Wundheilung beteiligten Myofibroblasten und die Wundkontraktion könnten mit der Wanderung des Transponders assoziiert sein.

Die Frage, welche Gewebsreaktion eine Migration verhindert oder reduziert, wird unterschiedlich diskutiert. Sehr häufig wird angegeben, die bindegewebige Einkapselung des Transponders limitiere seine Migration und fixiere ihn lokal (BEHLERT und WILLMS, 1992; GABEL et al., 1988; GRUYS et al., 1993; KONERMANN, 1994; NIGGEMEYER, 1994). MADER et al. (2002) meinen, die in ihrer Studie in zwei Fällen beobachtete zu dünne Bindegewebetskapsel könne der Grund für die starke Migration dieser Transponder sein.

PIRKELMANN und KERN (1994) sagen, ein intensiveres Einwachsen des Transponders ins umgebende Gewebe habe eine bessere Fixierung am Injektionsort zur Folge.

Es wird auch vermutet, eine beeinträchtigte Gewebeverträglichkeit (durch Kunststoffüberzüge des Transponders) könne gleichzeitig zu einer besseren Ortstabilität führen (GEISEL et al., 1998). RAO und EDMONDSON (1990) sagen, der Sinn der Polypropylen-Kappe bei PP-Transpondern sei es, eine milde Gewebsreaktion hervorzurufen und dadurch den Transponder an der Implantationsstelle zu immobilisieren.

In der Untersuchung von JANSEN et al. (1999) waren einige Transponder von einer starken Entzündungsreaktion umgeben, die aber in keinem Zusammenhang mit der Wanderung der Transponder zu stehen schien.

Wie oben bereits erläutert, vermuten einige Autoren, das Einwachsen von Bindegewebe zwischen Bioglas und Polypropylenkappe würde diese Transponder vom Wandern abhalten bzw. den Transponder im Gewebe verankern (MURASUGI et al., 2003).

STEIN et al. (2003) gehen davon aus, dass morphologisch normales Gewebe in der Umgebung des Transponders wahrscheinlich eine Migration stoppt.

2.5.7 Die Oberflächenmaterialien der Transponder

Zusammenfassend wird Folgendes deutlich:

1. Das Oberflächenmaterial des Transponders scheint sowohl mit der Gewebeverträglichkeit als auch mit der Migration im Zusammenhang zu stehen.
2. Das Oberflächenmaterial ist offensichtlich die Transpondereigenschaft mit dem größten Einfluss auf die Gewebereaktion, es lässt sich außerdem gut variieren.

Die in dieser Studie relevanten Oberflächenmaterialien sollen hier kurz vorgestellt werden.

Es wurden drei Materialien verwendet, die als Transponderoberflächen schon seit Jahren auf dem Markt sind, nämlich Bioglas (ohne zusätzliche Beschichtung), Parylene C und Polypropylen (in Form einer Polypropylenkappe auf einem Bioglas-Transponder), ferner zwei Materialien, die noch nie als Transponderbeschichtung zum Einsatz kamen: Titan und Aluminiumoxyd.

2.5.7.1 Bioglas

Bioglas ist eine Glasart, die auf der Grundlage von SiO_2 basiert. Zusätze wie alkalische Oxide verleihen ihm eine spezifische Oberflächenreaktivität, welche die Interaktion mit dem umliegenden Gewebe fördert (WILLIAMS, 1999).

Bioglas enthält neben Silikaten auch Kalzium, Kalium, Magnesium, Eisen und Aluminium (ANONYMUS, 1990). Es gilt als chemisch stabil und undurchlässig für Flüssigkeiten.

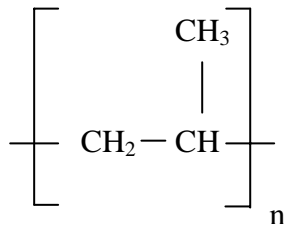
Bioglas und andere Glaskeramiken werden häufig als Knochenimplantate in der Humanmedizin verwendet, z.B. in der Orthopädie sowie der Zahn- und Kieferchirurgie (ANONYMUS, 1990; ZHONG et al., 2002). Bioglas hat die Eigenschaft, sich schnell mit Körpergewebe zu verbinden und das Wachstum von Knochengewebe zu stimulieren (ZHONG et al., 2002).

In mehreren Studien wurde Bioglas eine gute Verträglichkeit bescheinigt, die seine Eignung als Kapselmaterial für Transponder begründet (JANSEN et al., 1999; MADER et al., 2002). ANONYMUS (1990) kommt zu dem Schluss, dass sich Bioglas eindeutig als Kapselmaterial für Implantate qualifiziert, und zwar durch seine gute Gewebekompatibilität, seine Stabilität und seine fehlende systemische Toxizität.

Aus diesen Gründen hat sich Bioglas als wichtigstes Oberflächenmaterial von Transpondern durchgesetzt (OBER, 1998).

2.5.7.2 Polypropylen

Polypropylen gehört zu den Polyolefinpolymeren. Die Strukturformel lautet:



Es besitzt eine hohe Härte und eine gute Chemikalienbeständigkeit. Weniger beständig ist es in aromatischen Kohlenwasserstoffen und sehr empfindlich gegenüber Oxidationsmitteln.

Polypropylen findet Verwendung in der Verpackungs-, Textil- und Bekleidungsindustrie (RÖMPP, 1995; Webseite Nr. 2, Aufruf Jan/Feb 2006, s. Zitate „8.2. Webseiten“).

In der Human- und Veterinärmedizin wird Polypropylen als Nahtmaterial verwendet und hat in der Humanmedizin Bedeutung z.B. bei Netzen (Meshes) zur chirurgischen Versorgung von Bauchwandhernien (KLINGE et al., 1999).

Die Firma Destron Fearing (heute Digital Angel Corporation, South St. Paul, USA) hat die Polypropylenkappe Ende der 80er Jahre entwickelt und unter dem Namen BioBond® als Antimigrationskappe patentieren lassen.

Nach eigenen Angaben verhindert sie die Bewegung des Transponders von der Implantationsstelle (Webseite Nr. 10, Aufruf Jan/Feb 2006, s. Zitate „8.2. Webseiten“). Auch ARNDT und WIEDEMANN (1991) geben an, dass die Hülse eine Migration verhindere.

Wie schon mehrfach erwähnt, wurde in verschiedenen Studien ein Einwachsen von Bindegewebe in die Spalten zwischen der Polypropylenkappe und dem Bioglas beobachtet und daraus die Vermutung abgeleitet, dass dieses Einwachsen den Transponder im Gewebe immobilisiert bzw. verankert (MURASUGI et al., 2003; RAO und EDMONDSON, 1990).

Die Polypropylenkappe nimmt ca. die Hälfte des Transponders ein (Abb. 1). Sie weist zwei runde Vertiefungen in der Mitte auf, die laut ARNDT und WIEDEMANN (1991) der stabilen Verankerung im Gewebe dienen.

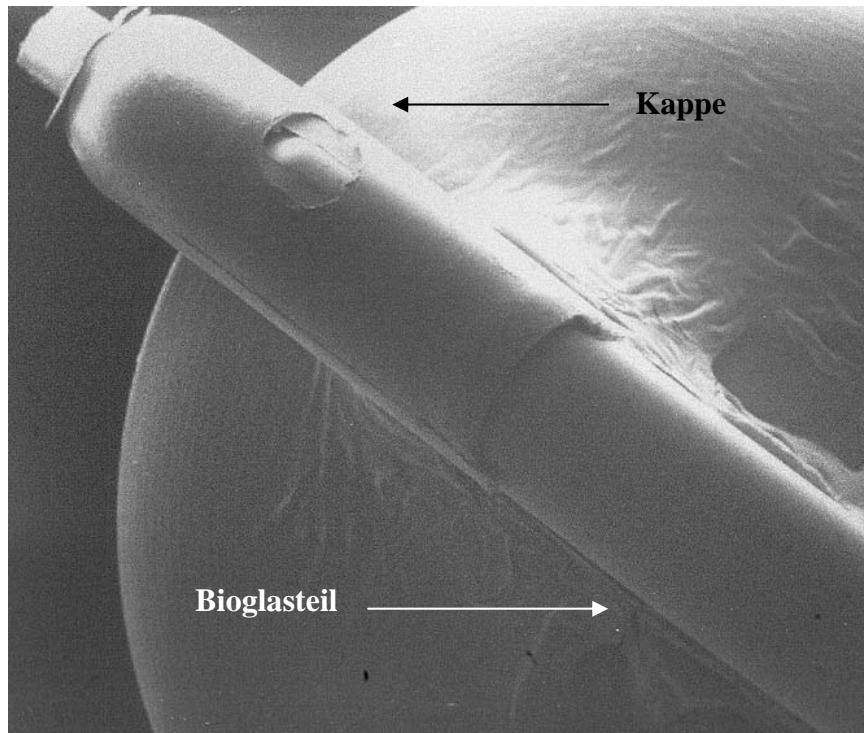


Abb. 1: Transponder mit Polypropylenkappe im Rasterelektronenmikroskop (eigene Aufnahme); REM, 10x

2.5.7.3 Parylene C

Parylene C ist das Polymer der Verbindung para-Chloro-Xylylen (Abb. 2).

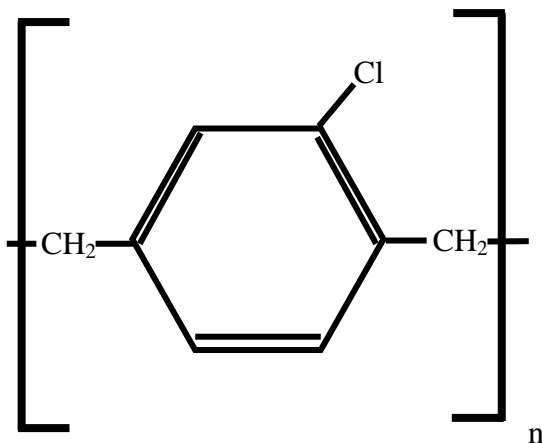


Abb. 2: Strukturformel von Parylene C

Es ist hydrophob und unlöslich in Alkoholen (BACHER, 2005) sowie sonstigen organischen Lösungsmitteln. Außerdem ist es elektrisch stabil und kann als elektrisches Isolationsmaterial verwendet werden. Parylene C ist weiterhin sehr beständig bei Temperaturen zwischen -200°C und $+150^{\circ}\text{C}$.

Das Material kommt seit ca. zwei Jahrzehnten als Beschichtung für elektronische Geräte in vielen verschiedenen Bereichen zum Einsatz, z.B. in der Raumfahrt und beim Militär. Aber es wird auch in der Medizintechnik verwendet als Beschichtung von Kathetern und biomedizinischen Schläuchen zur Verringerung der Reibung und zum Schutz vor Korrosion (Webseite Nr. 12, Aufruf Jan/Feb 2006, s. Zitate „8.2. Webseiten“).

In einem Review (Webseite Nr. 11, Aufruf Jan/Feb 2006, s. Zitate „8.2. Webseiten“) wird ein Überblick über bisherige Erfahrungen mit Parylene C im medizinischen Bereich gegeben. Bisher ist nicht berichtet worden, dass es sich in biologischen Systemen abnutzt bzw. verändert; es gibt einen Bericht, wonach die Parylene C-Beschichtung von Mikroelektroden nach einigen Monaten im Tierkörper belastungsbedingte Risse und oberflächliche Krater („Pinholing“) aufwies, wodurch die Funktionsfähigkeit der Elektroden beeinträchtigt wurde. Parylene C besitzt keine akute Toxizität. In den aufgeführten In-vivo-Untersuchungen handelte es sich ohne Ausnahme um zerebrale Implantate.

Es wird allgemein angenommen, dass Parylene C untoxisch und biokompatibel ist (Webseite Nr. 11, Aufruf Jan/Feb 2006, s. Zitate „8.2. Webseiten“).

Die Firma Pet ID (Pet-ID UK Limited, Hurstpierpoint, West Sussex, Großbritannien) verwendet Parylene C als Beschichtung für ihre Transponder und bezeichnet dies als „anti-migratory coating“ (FRY und GREEN, 1999; Webseite Nr. 15, Aufruf Jan/Feb 2006, s. Zitate „8.2. Webseiten“).

2.5.7.4 Titan

Titan ist ein Metall aus der Gruppe der Übergangsmetalle mit der Ordnungszahl 22. Es ist silbrig- oder weiß-metallisch glänzend und zeichnet sich durch hohe mechanische Festigkeit aus. Titan bildet in Gegenwart von Sauerstoff oberflächlich sofort eine Oxidschicht (Titandioxid, TiO_2), die außerordentlich korrosionsbeständig ist. Die Beständigkeit gegenüber Chemikalien ist temperaturabhängig, so ist es bei Raumtemperatur z.B. beständig gegenüber Alkoholen, Ameisensäure u.a., nimmt bei höheren Temperaturen aber leicht O_2 und H_2 auf.

Anwendung findet Titandioxid z.B. als untoxisches weißes Farbpigment in Lebensmitteln als Lebensmittelzusatz E171 Verwendung. Außerdem wird Titan wegen seiner mechanischen Stabilität und Leichtigkeit gerne für Körperschmuck und Brillen verwendet (RÖMPP, 1995; Webseite Nr. 3, Aufruf Jan/Feb 2006, s. Zitate „8.2. Webseiten“).

Titan ist auch als Implantatmaterial sehr beliebt, z.B. für extramedulläre Platten oder intramedulläre Nägel zur internen Fixation von Knochenbrüchen (LEITING et al., 2001).

Es wurde oft beobachtet, dass Titanimplantate regelrecht vom Knochen integriert wurden. Es gilt auch sonst als exzellent biokompatibel (POHLER, 2000).

Auch in vitro zeigt Titan keine negativen Auswirkungen auf Zellkulturen (POHLER, 2000).

2.5.7.5 Aluminiumoxyd

Aluminiumoxyd (Tonerde) ist ein farbloses Pulver. Es ist zwar wasserunlöslich, aber hydrophil und dadurch von wässrigen Flüssigkeiten leicht benetzbar. In seiner Modifikation als $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ ist es gut löslich in starken Säuren und Basen, geht ab über 1000°C aber in $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ über, einen Zustand, in dem es nicht mehr löslich ist. $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ kommt in der Natur als Korund vor und zeichnet sich durch eine große Härte aus. Aluminiumoxyd kann durch seine höchst mögliche Oxidationsstufe als chemisch inert betrachtet werden (CHRISTEL, 1992; RÖMPP, 1995; Webseite Nr. 1, Aufruf Jan/Feb 2006, s. Zitate „8.2. Webseiten“).

Außerdem weist es eine hohe Korrosionsbeständigkeit auf (HANNOUCHE et al., 2005).

Unter den Biomaterialien gehört es zur Gruppe der Metalloxid-Keramiken. Seit 1984 ist es als biokompatibles und biostabiles Knochenersatzmaterial standardisiert in der ISO-Norm 6474 (HANNOUCHE et al., 2005).

Bei NEUMANN et al. (2004) wird es als Prototyp der bioinerten Keramik bezeichnet. Es findet in der Humanmedizin häufig Verwendung für Hüftgelenksprothesen sowie in der Otorhinolaryngologie. Auch schon in früheren Studien werden Al_2O_3 exzellente biokompatible Eigenschaften zugesprochen (ANNEROOTH et al., 1990).

Außerdem gilt es bei In-vitro-Zytotoxizitätstests als untoxisches Referenzmaterial gemäß ISO 10993-12 (NEUMANN et al., 2004). Auch CHRISTEL (1992) verweist in seinem Review auf die guten Ergebnisse in vitro.

In bisherigen Studien über Transponder wurden nur von JANSEN et al. (1999) die Reaktionen auf zwei dieser fünf Materialien histopathologisch miteinander verglichen, und zwar auf Bioglas und Polypropylen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Soweit bekannt, wurden die In-vivo- und In-vitro-Reaktionen auf die genannten fünf Materialien bisher in keiner Studie miteinander verglichen.

GRUYS et al. (1993) untersuchten die Zytotoxizität von Glastranspondern in vitro, nach eigenem Wissensstand wurde jedoch das Wachstum von Zellkulturen auf Transpondern rasterelektronenmikroskopisch noch nie untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Transponder

Es wurden Transponder mit fünf verschiedenen Oberflächenmaterialien verwendet:

1. reines Bioglas ohne zusätzliche Beschichtung (Bioglas, BG) (Fa. Datamars S.A., Bedano-Lugano, Schweiz)
2. Bioglas mit Polypropylenkappe (PP) (Fa. Digital Angel Corporation, South St. Paul, USA)
3. Bioglas beschichtet mit Parylene C (PA) (Fa. Business Inception Identification B.V., Otterlo, Niederlande)
4. Bioglas beschichtet mit Aluminiumoxyd (AL) (Fa. Planet ID GmbH, Essen)
5. Bioglas beschichtet mit Titan (Ti) (Fa. Planet ID GmbH, Essen)

Von den genannten Materialien sind nur die ersten drei bei im Handel erhältlichen Transpondern üblich, Aluminiumoxyd und Titan hingegen nicht.

Vier der fünf Transpondertypen hatten die Maße von 12 mm x 2 mm. Einzig die Polypropylen-Transponder waren ca. 14 mm x 2,5 mm groß.

Die verwendeten Transponder unterschieden sich auch hinsichtlich der Injektionssysteme.

AL- und Ti-Transponder wurden in der In-vivo-Studie mit dem mehrfach verwendbaren Transponderinjektor nach Hüther (Fa. Planet ID GmbH, Essen) injiziert, wobei die Transponder in separaten Kanülen steril verpackt waren, die auf das Injektionsgerät aufgesteckt wurden.

Bei der In-vitro-Studie befanden sich diese Transponder entweder ebenfalls in Kanülen steril verpackt, wurden aber mit einem anderen mehrfach verwendbaren Injektionsgerät, dem so genannten Spritzeninjektor (Fa. Planet ID GmbH, Essen) appliziert. Oder sie waren lose steril in einer Blisterverpackung eingeschweißt und wurden mit einer Pinzette entnommen.

Bei den anderen Injektionssystemen handelte es sich um Einmal-Injektionssysteme, d.h. der Transponder befand sich zusammen mit dem Injektionsgerät in einer sterilen Verpackung, das Injektionsgerät wurde nach einmaliger Verwendung entsorgt.

Alle Transponder waren vor der Lieferung mittels Ethylenoxid (ETO) sterilisiert worden.

Einzig im In-vitro-Versuch wurden zusätzlich unsterile Aluminiumoxyd- und Titantransponder verwendet, die vor dem Versuch autoklaviert wurden (siehe „3.3.1 Transponder“)

Der Innendurchmesser der meisten Kanülen betrug jeweils 2,6 mm, bei dem System für Polypropylen allerdings 3,0 mm.

Im Folgenden wird gelegentlich von den verschiedenen „Transpondertypen“ gesprochen; damit sind natürlich die fünf verschiedenen Oberflächenmaterialien gemeint.

3.2 In-vivo-Studie

3.2.1 Transponder und Lesegerät

Transponder: siehe „3.1 Transponder“

Lesegerät: Bei dem verwendeten Gerät (Breeder Reader®, Fa. Planet ID GmbH, Essen) handelte es sich um ein RFID-Lesegerät für FDX-B kompatible ISO11784/11785-Transponder.

3.2.2 Tiere

Es wurden insgesamt 48 Mäuse vom Stamm NMRI der Firma Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, aus fünf unterschiedlichen Gruppen untersucht. Sie wurden im Rahmen einer Bestandsuntersuchung im Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen seziert.

Die Tiere wurden in Typ 4 Käfigen aus Kunststoff mit den Maßen 600 x 380 x 200 mm gehalten. Als Futter wurde 2016 Teklad Global 16% Protein Nagerdiät verwendet. Der Wechsel der Einstreu fand dreimal pro Woche statt.

Alle Tiere waren weiblich und zum Zeitpunkt der Implantation ca. drei Wochen alt.

3.2.3 Methoden

3.2.3.1 Implantation der Transponder

Jede der fünf untersuchten Gruppen war mit Transpondern eines anderen Oberflächenmaterials markiert worden. Die Implantation der Transponder fand wie folgt statt: Die Tiere wurden zur Sedation in einen geschlossenen Glaszylinder gesetzt, in dem sich ein mit Ether getränkter Wattebausch befand. Nach 30 Sekunden bis einigen Minuten wurde jeder Maus mit dem jeweiligen Injektionsgerät der Transponder implantiert: Medial zwischen den Schulterblättern wurde eine Hautfalte gebildet und die Kanüle mit dem Transponder parallel zur Wirbelsäule subkutan eingeführt.

Durchgeführt wurde die Implantation von einem Tierpfleger der Firma Harlan Winkelmann GmbH in Anwesenheit des zuständigen Tierarztes. Anschließend wurden die Mäuse wieder in ihre Käfige gebracht.

Zukünftig werden die Gruppen wie folgt angesprochen:

Gruppe 1: Bioglas

Gruppe 2: Polypropylen

Gruppe 3: Parylene C

Gruppe 4: Titan

Gruppe 5: Aluminiumoxyd

Die Mäuse wurden routinemäßig versorgt (Fütterung, Reinigung der Käfige usw.) und regelmäßig von den Tierpflegern der Firma Harlan Winkelmann GmbH adspektorisch auf Auffälligkeiten hin kontrolliert.

Im Alter von zehn Wochen wurden die Mäuse durch CO₂-Begasung euthanasiert. Die Tierkörper wurden in 4 %igem neutral gepuffertem Formalin (siehe Anhang „9.2.1 Formalin“) fixiert. Zum schnelleren Eindringen des Formalins ins Gewebe wurden die Brust- und Bauchhöhle der Mäuse mit einem ventralen Längsschnitt in der Medianebene eröffnet.

3.2.3.2 Makroskopische Untersuchung

Das weitere Vorgehen erfolgte im Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Es wurden 48 Mäuse zur Untersuchung geliefert.

Vor der Sektion wurden alle Mäuse mit einem Lesegerät (siehe „3.2.1 Transponder und Lesegerät“) gescannt.

Ergebnisse beim Scannen:

Aus Gruppe 1 (BG) wurde bei einer Maus kein Transponder angezeigt.

Aus Gruppe 5 (AL) wurde bei einer Maus kein Transponder angezeigt.

In beiden Fällen konnte auch nach sorgfältiger makroskopischer Suche kein Transponder gefunden werden.

3.2.3.3 Entnahme der Transponder und Anfertigung der histologischen Schnitte

Die Haut über dem Transponder wurde vorsichtig auf einem ca. 1,5 x 2,5 cm großen Rechteck rasiert. Dann wurde mit der Rasierklinge um den Transponder herum ein annähernd quaderförmiges Gewebestück (ca. 1 x 2,5 x 0,7 cm) ausgeschnitten, so dass der Transponder von allen Seiten noch großzügig mit Gewebe umgeben war (Abb. 3). Der Gewebequader wurde vom Tierkörper gelöst.

Auf der basalen, der Hautoberfläche entgegengesetzten Seite des Gewebequaders wurde nun ein Längsschnitt auf Höhe des Transponders vorgenommen, der Transponder an einem Pol mit einer Pinzette gefasst und unter vorsichtigen Drehbewegungen aus dem Quader herausgelöst (Abb. 4).

Der Gewebequader mit dem nun entstandenen zentralen Hohlraum wurde anschließend quer zur Längsrichtung zerteilt, und zwar in 3 bis 6 gleichgroße Stücke (Abb. 5)

Diese Stücke wurden so in die Einbettkassette gelegt, dass jeweils die neue Schnittfläche nach unten zeigte.

Bei Polypropylen wurden je Transponder zwei Einbettkassetten angefertigt: In eine kam das Gewebe, das um die Polypropylenkappe lag, in die andere das um den Bioglasteil des Transponders.

Im Weiteren wurden die Proben nach dem Routineverfahren im Einbettungsautomat (Tissue Tek[®] Vacuum Infiltration Processor, Fa. Vogel Wilhelm GmbH, Gießen) weiter prozessiert und schließlich in Paraffin (Histo-Comp[®] Gewebeeinbettmittel, Fa. Vogel Wilhelm GmbH, Gießen) eingebettet.

Aus den Paraffinblöcken wurden Schnitte mit einer Dicke von 3-5 µm hergestellt, im Wasserbad bei ca. 40°C gestreckt und auf Objektträger aufgezogen. Anschließend erfolgte eine Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung. In der Regel wurden von einem Paraffinblock mehrere Schnitte hergestellt.

Die histologische Untersuchung erfolgte lichtmikroskopisch bei den Vergrößerungen 2,5fach, 10fach, 20fach, 40fach und 100fach.

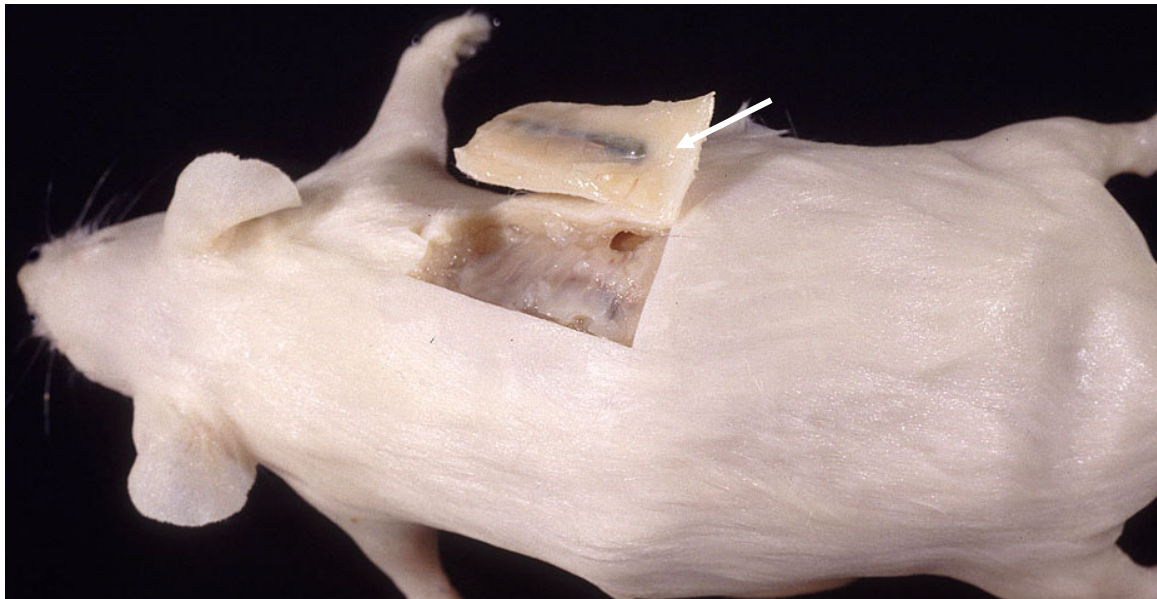


Abb. 3: Gewebequader mit Transponder, noch am Körper der Maus befindlich (Pfeil)



Abb. 4: Entfernung des Transponders aus dem Gewebequader



Abb. 5: Stück vom Gewebequader ohne Transponder, quer

3.2.3.4 Auswertung der histologischen Befunde

Zur Auswertung wurden im Schnitt zwei Zonen unterschieden:

1. das Gewebe direkt um den Hohlraum, in dem der Transponder vorher war (i.d.R. eine mehr oder weniger deutliche Bindegewebskapsel, im Weiteren „**Kapsel**“ genannt);
2. das sich unmittelbar anschließende Gewebe (im Weiteren „**perikapsuläres Gewebe**“ genannt, i.d.R. lockeres Bindegewebe).

Wenn ein Befund nur in einem der Stücke des zerteilten Gewebequaders zu finden war, so wurde dieser Befund eingeleitet mit: „ein Anschnitt:“

Folgende Kriterien wurden ausgewertet:

Kapsel

I. Kapseldicke

Die Kapseldicke wurde semiquantitativ ausgewertet:

- dünn: weniger als 4 Fibrozytenlagen
- mittel: zwischen 4 und 6 Fibrozytenlagen
- dick: mehr als 6 Fibrozytenlagen

Falls die Kapsel unterschiedlich dicke Bereiche aufwies, wurde die vorherrschende Kapseldicke angegeben; zusätzlich genannt wurde die Dicke der Bereiche, die von dem überwiegenden Wert abwich.

II. Makrophagen (MØ)

a) MØ-Ansammlung(en)

Der Ausprägungsgrad von Makrophagen-Ansammlungen wurde semiquantitativ ausgewertet:

- (+) = minimal (ein bis zwei Zellen)
- +
- ++ = mittelgradig (neun bis vierzehn Zellen)
- +++ = hochgradig (mehr als vierzehn Zellen)

Die Verteilung von Makrophagen-Ansammlungen in der Kapsel wurde wie folgt angegeben:

- = nicht vorhanden
- fokal = 1-2 Lokalisationen mit Zell-Ansammlungen
- multifokal = mehr als zwei Lokalisationen mit Zell-Ansammlungen

Wenn neben der Makrophagen-Ansammlung auch andere Strukturen beteiligt waren, es sich also um ein komplexer aufgebautes Granulom handelte, so wurde seine Zusammensetzung näher beschrieben.

b) innere Lage aus MØ

Dieses Kriterium bezieht sich auf die direkte Kontaktfläche zwischen Kapsel und Transponder.

- = nicht vorhanden
- x = vorhanden

c) mehrere Lagen MØ

Mit diesem Kriterium wurde berücksichtigt, ob zwischen den kollagenen Fasern der Bindegewebskapsel mehrere Schichten Makrophagen vorhanden waren oder nicht.

- = nicht vorhanden
- x = vorhanden

d) mehrkernige Riesenzellen

Die semiquantitative Bewertung des Ausprägungsgrads sowie die Angaben zur Verteilung der gefundenen mehrkernigen Riesenzellen erfolgten wie unter „a) MØ-Ansammlung(en)“.

III. andere Entzündungszellen und -zeichen

- Benennung
- Angaben zur Verteilung (diffus, fokal, multifokal)
- semiquantitative Beschreibung des Ausprägungsgrads

Dabei gelten die Definitionen wie unter „II. Makrophagen (MØ)“.

Unter „diffus“ wird eine gleichmäßige, flächendeckende Verteilung verstanden, die keine Abgrenzung in mehrere voneinander getrennte Lokalisationen ermöglicht.

IV. Sonstiges

- Benennung
- Angaben zur Verteilung (diffus, fokal, multifokal)
- semiquantitative Beschreibung des Ausprägungsgrads

Dabei gelten die Definitionen wie unter „II. Makrophagen (MØ)“ bzw. „III. andere Entzündungszellen und -zeichen“, ggf. erfolgte eine Größenangabe im Vergleich zur durchschnittlichen Größe von Erythrozyten (ca. 6 µm):

- klein = 1-10 Erythrozyten
- mittel = 11-30 Erythrozyten
- groß = über 30 Erythrozyten

Perikapsuläres Gewebe

Gewebsreaktion

- Benennung
- Angaben zur Verteilung (diffus, fokal, multifokal)
- semiquantitative Beschreibung des Ausprägungsgrads

Dabei gelten die Definitionen wie unter „Kapsel - II. Makrophagen (MØ)“ bzw. „Kapsel - III. andere Entzündungszellen und -zeichen“, ggf. erfolgte eine Größenangabe im Vergleich zur durchschnittlichen Größe von Erythrozyten (ca. 6 µm):

- klein = 1-10 Erythrozyten
- mittel = 11-30 Erythrozyten
- groß = über 30 Erythrozyten

Der Ausprägungsgrad der Bindegewebsproliferation im perikapsulären Gewebe wurde wie folgt semiquantitativ beschrieben:

- wenig
- mäßig
- stark

Für jede der drei Kategorien diente ein repräsentatives Präparat als Vergleich.

Andere Kriterien, die nicht den beiden Zonen zugeordnet wurden**Haargranulome**

- Angaben zur Verteilung (fokal, multifokal)
- semiquantitative Beschreibung des Ausprägungsgrads

Dabei gelten die Definitionen wie unter „Kapsel - II. Makrophagen (MØ)“.

Haargranulome in der Kapsel wurden bei den sonstigen Granulomen, Makrophagen- und/oder Riesenzellansammlungen nicht mitgewertet und separat aufgeführt.

Sonstige Bemerkungen und Befunde

- Benennung
- Angaben zur Verteilung (diffus, fokal, multifokal)
- semiquantitative Beschreibung des Ausprägungsgrads

Dabei gelten die Definitionen wie unter „II. Makrophagen (MØ)“ bzw. „III. andere Entzündungszellen und -zeichen“, ggf. erfolgte eine Größenangabe im Vergleich zur durchschnittlichen Größe von Erythrozyten (ca. 6 µm):

- klein = 1-10 Erythrozyten
- mittel = 11-30 Erythrozyten
- groß = über 30 Erythrozyten

3.2.3.5 Kontrollproben

Von jeder Maus wurde zusätzlich ein Stück Haut mit Unterhautgewebe entnommen, und zwar von einem Hautbereich, der keinen Kontakt zum Transponder hatte (seitliche Brustwand). Nach der Aufbereitung zur histologischen Untersuchung wurden die Kontrollen mit den Befunden des Gewebes um den jeweiligen Transponder desselben Tieres verglichen. Der Ausprägungsgrad und die Verteilung von Entzündungszellen und -zeichen wurden wie oben angegeben (siehe „3.2.3.4 Auswertung der histologischen Befunde“).

3.2.3.6 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von Transpondern der Mäuse

Aus jeder Gruppe wurden jeweils fünf Transponder zur rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung vorbereitet und im Rasterelektronenmikroskop betrachtet, und zwar nach den unter „3.3.4.5 Herstellung von Präparaten für das Rasterelektronenmikroskop“ und „3.4.8 Betrachtung und Auswertung der Präparate im Rasterelektronenmikroskop (REM)“ dargestellten Verfahren.

3.3 In-vitro-Studie

3.3.1 Transponder

Siehe „3.1 Transponder“

In der In-vitro-Studie wurden bei den Materialien Titan und Aluminiumoxyd zusätzlich je zwei Transponder verwendet, die nicht Ethylenoxid-sterilisiert waren, sondern vor dem Versuch am Institut für Veterinär-Pathologie autoklaviert wurden (Varioklav, Dampfsterilisator Typ 250T, Fa. H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim). Es sollte verglichen werden, ob die Sterilisationsmethode einen Einfluss auf das Ergebnis in vitro hat.

3.3.2 Zelllinien

Verwendet wurden zwei verschiedene permanente Zelllinien aus feline Fibrosarkomen, die am Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen im Rahmen einer anderen Dissertation etabliert worden waren (LÖHBERG-GRÜNE et al., 2004). Es handelt sich um die Linien FS I und FS VI.

3.3.3 Kultivierungsbedingungen und Zubehör

- a) Kulturflaschen mit 25 cm² Kulturoberfläche (Nunclon, Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark)
- b) Zellkulturmedium: DMEM High Glucose (4,5 g/l) with Glutamine, Fa. PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Zusätze: Antibiotika und Fetales Kälberserum (siehe Anhang „9.2.3 Zellkulturmedium“)

- c) Wasserbad: Typ 3047, Fa. Fisher Scientific UK Limited, Loughborough, Leicestershire, Großbritannien
- d) Zentrifuge: Rotina 48 RC, Hettich-Zentrifugen GmbH, Tuttlingen
- e) Brutschrank: FunctionLine, Fa. Heraeus Instruments/Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold
 - Bebrütung bei 37°C mit 5 % CO₂

Die Pflege der Zellkulturen erfolgte gemäß dem Protokoll im Anhang (siehe „9.3 Protokoll zur Zellkulturversorgung“).

3.3.4 Methoden

3.3.4.1 Ablegen der Transponder in die Zellkulturflaschen und Zugabe der Zellen

Pro Zelllinie wurden acht Zellkulturflaschen mit jeweils 6 ml Zellkulturmedium gefüllt. Die Zellkulturflaschen vom Typ „Nunclon“ (Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark) hatten die gleiche Kulturoberfläche von 25 cm² wie die sonst verwendeten Flaschen (siehe Anhang „9.3 Protokoll zur Zellkulturversorgung“). Sie fanden in diesem Versuch Verwendung, da sie um 3 mm höher waren als die anderen Zellkulturflaschen, was die Entnahme der Transponder erleichterte.

Je zwei Transponder eines Typs wurden in eine Zellkulturflasche platziert, und zwar mit Hilfe des jeweiligen Injektionssystems (siehe „3.1 Transponder“) oder aber - bei den Transpondern, die in Blisterverpackungen eingeschweißt bzw. autoklaviert waren - mit Hilfe einer sterilen Pinzette. Je eine Kontrollflasche blieb ohne Transponder.

Eine bereits seit einer Woche bestehende Zellkultur wurde nun passagiert (Protokoll siehe Anhang „9.3 Protokoll zur Zellkulturversorgung“). Beide Zelllinien hatten zu diesem Zeitpunkt eine Konzentration von etwa 3-4 Mio. Zellen/ml.

Aus dem Zellpellet, das man im Laufe der Passagierung durch Zentrifugation und Absaugen des Überstands gewann, wurde mit 4 ml statt mit 3 ml Zellkulturmedium eine Suspension hergestellt; das Volumen wurde erhöht, um das anschließende Abpipettieren der Suspension zu erleichtern.

Die Verteilung der Zellen in der Suspension wurde mit Hilfe eines Vortexers (RE AX 1 DR, Fa. Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Kelheim) durch dreimaliges Aufschütteln verbessert.

Alle acht Zellkulturflaschen wurden mit jeweils 150 µl der Suspension beschickt. Abschließend wurde jede Zellkulturflasche leicht geschüttelt, so dass die beiden Transponder am Ende der Flasche (Übergang vom Boden zur Stirnwand) zu liegen kamen (Abb. 6).

Bei vorsichtigem Umgang mit den Zellkulturflaschen blieben die Transponder durch Kapillarkräfte unbeweglich in dieser Position liegen.

Dieses Vorgehen wurde für die zweite Zelllinie wiederholt.

Die Zellkulturflaschen wurden im Brutschrank bei 37°C und bei 5% CO₂ bebrütet.

Der feste Sitz der Transponder wurde in den ersten Stunden nach Applikation regelmäßig durch Sichtkontrolle überprüft.

Auffälligkeiten

Bei den Transpondern aus reinem Bioglas war sowohl an der Außenseite der Kanüle des Injektionssystems als auch auf dem Transponder selbst eine zähe, leicht wachsartige, farblose, transparente Masse zu sehen.

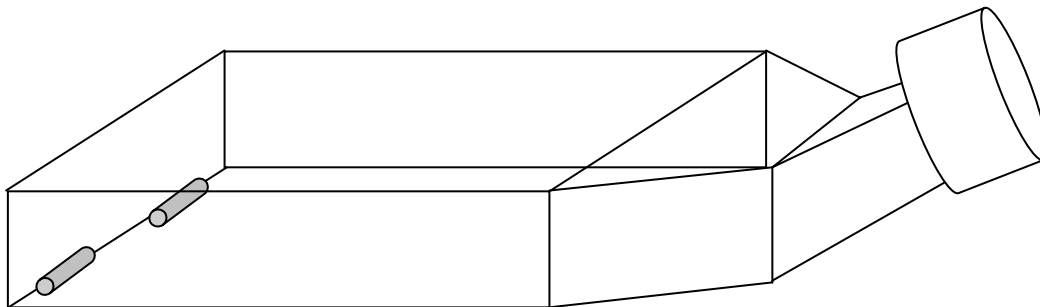


Abb. 6: Transponder liegen am Ende der Zellkulturflasche

3.3.4.2 Beurteilung der Zellverbandsdichte und -morphologie im Gewebekulturmikroskop nach Ende der Bebrütung

Die Bebrütungsdauer betrug drei Tage für die Zelllinie FS I und für die etwas langsamer wachsende Zelllinie FS VI vier Tage.

Die Zellkulturflaschen wurden makroskopisch auf den weiterhin festen Sitz der Transponder überprüft.

Anschließend erfolgte eine mikroskopische Beurteilung der Dichte des Zellverbands im Gewebekulturmikroskop bei den Objektivvergrößerungen 10fach und 20fach: Die Zellkulturflasche wurde mäanderförmig durchmustert und der Anteil der Zellen pro Gesichtsfeld eingeschätzt. Dies wurde für mehrere repräsentative Gesichtsfelder wiederholt, um einen Gesamteindruck zu erhalten.

Zusätzlich wurde auch die Zellmorphologie beschrieben.

Die Dichte des Zellverbands wurde nach folgendem Schema eingeteilt:

- minimale Dichte: weniger als $\frac{1}{4}$ des Gesichtsfeldes von Zellen bedeckt
- geringe Dichte: zwischen $\frac{1}{4}$ und der Hälfte des Gesichtsfeldes von Zellen bedeckt
- mittlere Dichte: zwischen der Hälfte bis $\frac{3}{4}$ des Gesichtsfeldes von Zellen bedeckt
- hohe Dichte: über $\frac{3}{4}$ des Gesichtsfeldes von Zellen bedeckt
- sehr hohe Dichte: die Zellen bilden einen annähernd geschlossenen Zellrasen (Monolayer)

Außerdem wurde die Dichte des Zellverbands in der Flaschenmitte verglichen mit jener am Flaschenrand (Kontroll-Kultur) bzw. in der unmittelbaren Umgebung des Transponders (Zellkulturflaschen mit Transpondern).

3.3.4.3 Plastikständer aus Polysterol zur mechanischen Fixierung der Transponder

Um die Transponder und die auf ihnen vorhandenen Zellen rasterelektronenmikroskopisch zu untersuchen, waren verschiedene chemische und physikalische Prozesse nötig, die weiter unten beschrieben werden. Gleichzeitig war es wichtig, die Transponder so wenig wie möglich zu berühren, um die auf ihnen vorhandenen Zellen nicht zu zerstören oder zu entfernen. Aus diesem Grund wurde folgende Konstruktion entwickelt:

Aus Polysterol (Polysterol weiß, Cadillac Plastic GmbH Kunststoff-Halbzeuge, Sulzbach) wurden Streifen mit den ungefähren Maßen 25 mm x 7 mm x 3 mm zurechtgesägt. Diese wurden dann über einer Gasflamme geringfügig angeschmolzen, so dass man einen unteren Teil von ca. 10 mm im rechten Winkel umbiegen konnte. Es entstand ein L-förmiger Ständer. Nach Abkühlung wurde mittig in den kürzeren Schenkel des Ständers ein Loch von ca. 1,9 mm Durchmesser gebohrt und anschließend so nachgearbeitet, dass ein Transponder genau hineinpasste (Abb. 7).

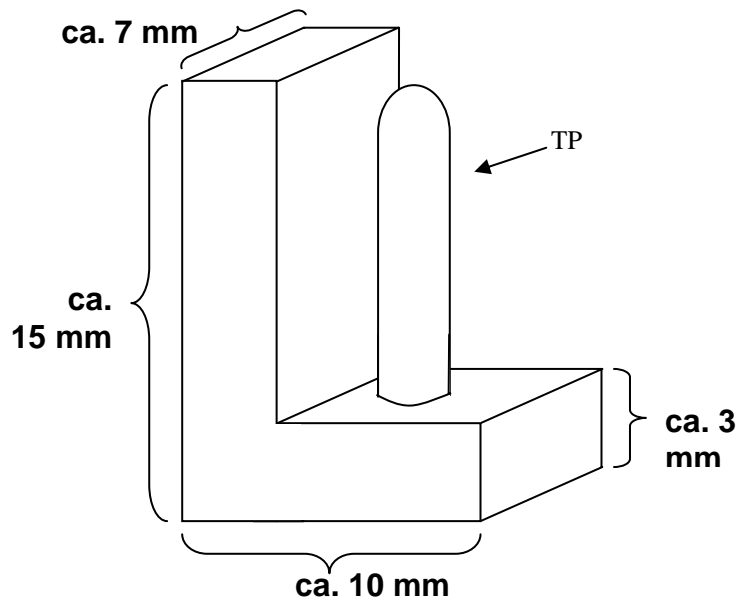


Abb. 7: Polysterol-Ständer zur mechanischen Fixierung des Transponders (TP)

3.3.4.4 Entnahme der Transponder aus der Zellkulturflasche, Einsetzen in den Polysterol-Ständer und chemische Fixierung

Jede Zellkulturflasche (außer der Kontrolle) wurde am hinteren Ende aufgeschnitten. (Abb. 8)

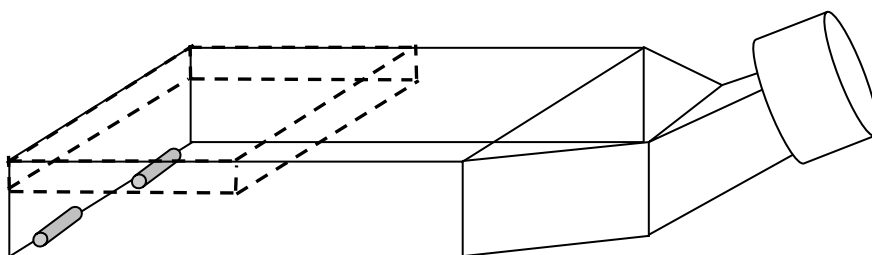


Abb. 8: Zellkulturflasche mit Transpondern; an der gestrichelten Linie wurde die Flasche aufgeschnitten

Der Transponder wurde mit Hilfe einer Pinzette entnommen, indem die Pinzette senkrecht von oben den Transponder im unteren Drittel fasste. Die PP-Transponder wurden im Bereich des Bioglas-Abschnitts gefasst.

Die Seite des Transponders, die in der Zellkulturflasche am Boden auflag, war also von der Pinzette abgewandt.

Der Transponder wurde nun in den oben beschriebenen Polyesterol-Ständer eingesetzt, so dass die der Pinzette abgewandte Transponderseite zum langen Schenkel des Ständers zeigte, und der von der Pinzette berührte Abschnitt nach unten gerichtet war (Abb. 9).

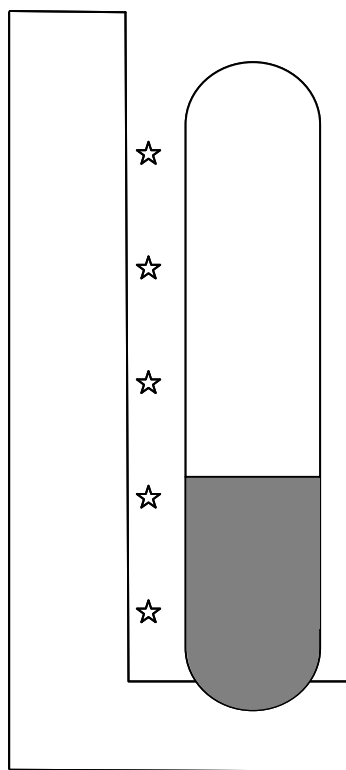


Abb. 9: Transponder im Polyesterol-Ständer

☆ = ursprüngliche Auflagefläche in der Zellkulturflasche

Grauer Bereich = mit der Pinzette berührter Abschnitt des Transponders

Die Ständer dienten der einfachen, zweifelsfreien Identifizierung, in erster Linie erlaubten sie aber einen weiteren Umgang mit dem Transponder, ohne ihn zu berühren.

Sobald ein Transponder fest in seinem Ständer steckte, wurde dieser mit Hilfe der Pinzette in ein Glasfläschchen gelegt, das mit 2,5% igem Glutaraldehyd gefüllt war.

Die Zellkulturflasche mit der Kontrolle wurde nicht aufgeschnitten; hier wurde das Medium abgeschüttet und 2,5%iger Glutaraldehyd hinzu gegeben.

Durch die eben beschriebene Methode konnte eine kontinuierliche Orientierung am Transponder gewährleistet werden; es war jederzeit klar, mit welcher Fläche er am Zellkulturboden aufgelegt hatte und welcher Abschnitt mit der Pinzette berührt worden war. An dieser Stelle soll erwähnt sein, dass die Transponder in der Zellkulturflasche auch an einer Seite Kontakt mit der Rückwand der Zellkulturflasche hatten. Diese Kontaktstelle lag, bedingt durch die Orientierung des Transponders auf dem Objekthalter im Rasterelektronenmikroskop jedoch immer ganz am Rand der betrachtbaren Transponderoberfläche.

Wenn bei Entnahme der Zellkulturflaschen aus dem Brutschrank festgestellt wurde, dass ein Transponder nicht mehr fest an der ursprünglichen Position saß, beweglich war oder sogar im Zellkulturmedium schwamm, dann wurde er nach dem Aufschneiden der Zellkulturflasche entsorgt und nicht weiter behandelt. Das gleiche geschah mit den Transpondern, die sich beim Umgang mit den Zellkulturflaschen lösten oder beim Umsetzen in den Ständer verrutschten oder abglitten (siehe „3.3.4.6 Nicht auswertbare Transponder“).

3.3.4.5 Herstellung von Präparaten für das Rasterelektronenmikroskop

Die Präparate (Transponder in Ständer) wurden wie folgt weiter behandelt:

1. viermaliges Spülen in Cacodylatpuffer (Gebrauchslösung, siehe Anhang „9.2.4 Chemikalien zur rasterelektronischen Untersuchung“) nach mindestens zweistündiger Fixierung in 2,5 %igem Glutaraldehyd
2. Nachfixierung mit 1%igem Osmiumtetroxid (siehe Anhang „9.2.4 Chemikalien zur rasterelektronischen Untersuchung „) für 30 bis 40 Minuten
3. viermaliges Spülen in Cacodylatpuffer (Gebrauchslösung, siehe Anhang „9.2.4 Chemikalien zur rasterelektronischen Untersuchung“)
4. Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe (1-Propanol; 1-Propanol > 99,5%ig, Fa. Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) in den Konzentrationsstufen 10% - 30% - 50% - 70% - 90% für jeweils 10 Minuten, abschließend dreimalige Entwässerung in 100%igem 1-Propanol für jeweils 10 Minuten

Die Kontrollkulturen wurden noch in der Zellkulturflasche ebenso behandelt. Allerdings wurde nach der letzten Entwässerungsstufe der Boden der Zellkulturflasche mit Hilfe einer heißen Mikrotomklinge zunächst in drei etwa gleich lange Streifen und schließlich in Stücke

von ca. 1 cm x 1 cm Kantenlänge zerschnitten. Im Folgenden wurden diese Stücke mit der Pinzette nur am Kantenrand gefasst, und es wurde immer darauf geachtet, dass die mit Zellen bewachsene Fläche nach oben zeigte.

Der Boden der Zellkulturflasche sowie die Transponder waren jederzeit von Flüssigkeit bedeckt.

Die Trocknung der Präparate erfolgte im Apparat zur Kritischen-Punkt-Trocknung (E3000 Series II, Fa. Polaron Equipment Limited, Watford, Hertfordshire, Großbritannien).

Jeweils drei Präparate bzw. drei Stücke mit Kontrolle wurden, bedeckt von 100%igem 1-Propanol, in den Apparat überführt.

Durch mehrmaliges Spülen mit Flüssig-CO₂ (Steigrohr-CO₂ flüssig, Fa. Messer Group GmbH, Sulzbach) wurde das 1-Propanol durch das flüssige CO₂ ersetzt: Insgesamt wurde im Abstand von 15 Minuten viermal gespült, wobei jeder Spülgang daraus bestand, das CO₂-Propanolgemisch viermal zur Hälfte abzulassen und dann reines Flüssig-CO₂ nachzufüllen. Am Schluss wurde die Temperatur im Apparat auf ca. 40°C erhöht.

Bei dieser Temperatur geht das CO₂ in die Gasphase über, ohne eine Phasengrenze zu bilden, so dass das Gewebe weitestgehend geschont wird. Gleichzeitig steigt auch der Druck im Apparat zur Kritischen-Punkt-Trocknung.

Das durch die Temperaturerhöhung gasförmig gewordene CO₂ wurde langsam abgelassen, bis der Druck im Apparat normales Niveau erreicht hatte.

Die getrockneten Transponder wurden mit der Pinzette aus den Plättchen entfernt und auf beschriftete, mit einem dünnen Film Graphitkleber (Colloidal Graphite, Isopropanol base, Fa. Taab Laboratories Equipment Ltd., Aldermaston, Berkshire, Großbritannien) bedeckte Stiftprobenteller (Fa. Plano GmbH, Wetzlar) geklebt.

Dabei wurde wieder so verfahren, dass die Transponder mit der Pinzette nur am unteren Ende gefasst wurden und mit jener Fläche auf dem Stiftprobenteller zum Liegen kamen, mit der sie auch in der Zellkulturflasche aufgelegt hatten.

Zuletzt wurde der Teil des Transponders, der die ganze Zeit mit der Pinzette in Berührung gekommen war, durch einen kleinen Tropfen Graphitkleber markiert.

Die Zellkulturflaschenboden-Stücke der Kontrollen wurden ebenfalls mit Graphitkleber auf Stiftprobenteller geklebt.

Diese Präparate wurden über Nacht, staubsicher abgedeckt, im Trockenschrank bei 40°C getrocknet.

Am folgenden Tag wurden sie in einer Sputteranlage (Sputter Anlage, Fa. Balzers Union Ltd., Liechtenstein) im Vakuum (0,1 Torr) bei einer Spannung von 65 V und einem Strom von ca. 17 mA für 4 Minuten mit Goldatomen gesputtert (Prinzip der Kathodenzerstäubung), um die Leitfähigkeit zu erhöhen.

Auch bei den eben beschriebenen Arbeitsschritten galt das Ausschlussprinzip: Wenn ein Transponder aus seinem Plättchen rutschte, das Plättchen umkippte oder herunterfiel oder ähnliche Zwischenfälle auftraten, so wurde der Transponder bei der Auswertung nicht berücksichtigt (siehe „3.3.4.6 Nicht auswertbare Transponder“).

3.3.4.6 Nicht auswertbare Transponder

Folgende Transponder wurden bei der Auswertung nicht weiter berücksichtigt, weil sie beim Einsetzen in den Ständer hinunterfielen:

Zelllinie FS I: Ti_a

Zelllinie FS VI: PA_b

Insgesamt standen somit zur Auswertung zur Verfügung:

Zelllinie FS I: je Oberflächenmaterial zwei Transponder, für Titan nur ein Transponder, zusätzlich je zwei autoklavierte Titan- und Aluminiumoxyd-Transponder → insgesamt 13 Transponder

Zelllinie FS VI: je Oberflächenmaterial zwei Transponder, für Parylene C nur ein Transponder, zusätzlich je zwei autoklavierte Titan- und Aluminiumoxyd-Transponder → insgesamt 13 Transponder

3.3.4.7 Aufbewahrung der Präparate

Die Präparate (Transponder/Kontrollstücke auf Stiftproben Tellern) wurden in passenden, vor Staub geschützten Platten in Gegenwart eines Trocknungsmittels (Kieselgel mit Feuchtigkeitsindikator [Blaugel], Fa. Merck KGaA, Darmstadt) und im Trockenschrank bei 40°C aufbewahrt.

3.3.4.8 Betrachtung und Auswertung der Präparate im Rasterelektronenmikroskop (REM)

Die Betrachtung der Präparate fand im Rasterelektronenmikroskop (Typ DSM 940, Fa. Carl Zeiss AG, Oberkochen) statt.

Am REM galten folgende Einstellungen:

Spannung: 15 kV

Arbeitsabstand: 15-16 mm

Einscannengeschwindigkeit zur Betrachtung und für Fotos: 16 Sekunden, 32 Sekunden oder 60 Sekunden

Die Aufsicht auf den Transponder im REM erfolgte senkrecht, d.h. auf den Abbildungen sieht man direkt auf jene Fläche, die auch in der Zellkulturflasche nach oben (Richtung Flaschendach) zeigte.

Wie oben bereits erwähnt, wurde der Transponder bei der Vorbereitung für die Rasterelektronenmikroskopie mit der Pinzette am unteren Drittel angefasst. Dadurch wurden Zellen zerstört, die evtl. auf diesem Abschnitt gewachsen waren. Aus diesem Grund wurde bei der Auswertung nur die vordere Hälfte berücksichtigt, womit jene Hälfte der Transponderoberfläche gemeint ist, die garantiert nicht berührt worden war (Abb. 10).

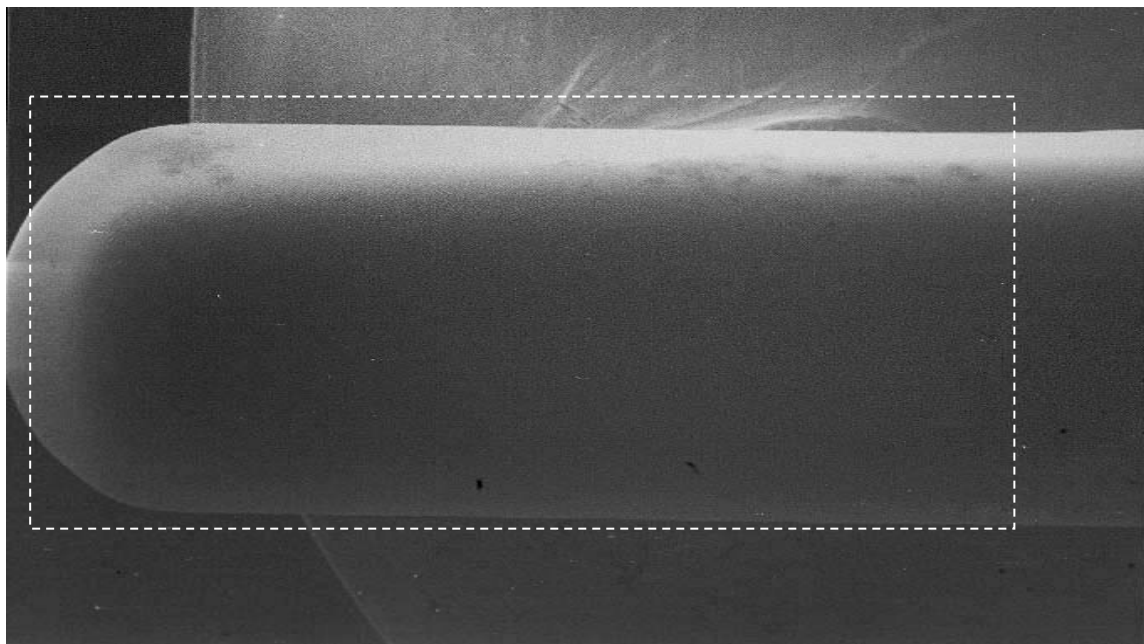


Abb. 10: senkrechte Aufsicht auf einen Transponder im REM; der auswertbare Bereich liegt etwa innerhalb der gestrichelten Linie (REM, 20x)

Auf der auszuwertenden Hälfte wurde mäanderförmig nach Zellen gesucht. Die Anzahl der Zellen wurde wie folgt eingeteilt:

- keine Zellen
- geringe Zellzahl: insgesamt weniger als 10 Zellen, die vereinzelt liegen.
- mäßige Zellzahl: zwischen 11 und 30 Zellen, die andeutungsweise einen Verband bilden.
- hohe Zellzahl: mehr als 30 Zellen, es ist ein deutlicher Verband zu erkennen.

Bei der Auswertung wurden weiterhin die Zellmorphologie sowie andere Auffälligkeiten – z.B. die Beschaffenheit der Transponderoberfläche – berücksichtigt.

Repräsentative Stellen des Transponders wurden fotografiert. Üblicherweise geschah dies bei den Vergrößerungen 100- und 200fach; teilweise stellte sich die Oberfläche der Transponder im REM jedoch sehr unregelmäßig dar, so dass bei diesen Vergrößerungsstufen oft nicht klar zwischen Zellen und Unebenheiten unterschieden werden konnte. In diesen Fällen wurden zusätzliche Aufnahmen bei stärkerer Vergrößerung gemacht. Zudem konnte bei stärkerer Vergrößerung die Zellmorphologie besser erkannt werden.

3.4 Andere Zellkultur-Untersuchungen mit Transpondern

3.4.1 Vorversuch mit den fünf Transpondertypen

Ein vorangegangener Versuch mit der Zelllinie FS I, der nach derselben eben beschriebenen Methode durchgeführt worden war, konnte nicht vollständig ausgewertet werden, da die beiden Titan-Transponder sowie ein Parylene C-Transponder nach der Bebrütungszeit entweder nicht fest in der Zellkulturflasche saßen oder beim Herausnehmen hinunterfielen. Die übrigen Transponder jedoch wurden wie oben beschrieben weiter behandelt und untersucht.

Auch wenn der Versuch nicht vollständig ist, sollen die Ergebnisse vorgestellt werden.

Beim Ablegen der Transponder in die Zellkulturflaschen konnte auf den Transpondern aus reinem Bioglas (BG) und der Kanüle des dazugehörigen Injektionssystems die leicht wachsartige, transparente Masse festgestellt werden, wie sie auch im Hauptversuch gesehen wurde (siehe „3.3.4.1 Ablegen der Transponder in die Zellkulturflaschen und Zugabe der Zellen“).

3.4.2 Zellkultur-Untersuchung mit drei verschiedenen Bioglas-Transpondern

In einem anderen Versuch wurde das Zellwachstums-Verhalten in Gegenwart von drei verschiedenen Bioglas-Transpondern untersucht. Dieser Versuch wird im weiteren Text auch „**Versuch III**“ genannt.

Material und Methoden entsprechen dem oben dargestellten Einzelheiten (siehe „3.3 In-vitro-Studie“), allerdings mit einigen Unterschieden:

1. Bei den Transpondern handelte es sich um folgende Bioglas-Transponder:
 - a) reines Bioglas (BG) (Fa. Datamars S.A., Bedano-Lugano, Schweiz)
 - b) reines Bioglas (BG2) (Fa. Planet ID GmbH, Essen)
 - c) reines Bioglas mit Silikon (SI) (Fa. Planet ID GmbH, Essen)
2. Die Zelllinie FS VI wurde fünf statt vier Tage inkubiert.
3. Es wurden andere Zellkulturflaschen verwendet (Iwaki brand, Scitech Division of Asahi Techno Glass Corporation, Tokio, Japan).

Die BG2- und SI-Transponder befanden sich in einer Kanüle steril verpackt und wurden mit einem Spritzeninjektor in die Zellkulturflaschen appliziert, während die BG-Transponder zusammen mit einem Einmal-Injektionssystem in steriler Verpackung vorlagen (siehe „3.1 Transponder“).

Das Silikon stellte keine vollständige Beschichtung der Transponder dar; vielmehr war im Herstellungsablauf beim Verpacken der Transponder eine kleine Menge davon in die Kanülen appliziert worden, und der Transponder kam also auf diese Weise mit Silikon in Kontakt. Laut HÜTHER (2006) dient das Silikon der Fixierung des Transponders im Lumen der Kanüle. Wenn Transponder nicht durch eine klebende Substanz oder eine mechanische Arretierung in der Kanüle fixiert würden, so bestehe die Gefahr, dass sie vorzeitig aus der Kanüle herausrutschen könnten.

Diese Untersuchung wurde durchgeführt, nachdem im Hauptversuch mit den fünf verschiedenen Transponder-Oberflächenmaterialien bei den BG-Transpondern die bereits erwähnte wachsartige Masse entdeckt wurde (siehe „3.3.4.1 Ablegen der Transponder in die Zellkulturflaschen und Zugabe der Zellen“); es sollte untersucht werden, ob die In-vitro-Reaktionen auf die BG-Transponder tatsächlich mit dem Material Bioglas zusammenhing oder evtl. auf die wachsartige Masse zurückzuführen war.

Auffälligkeiten:

Beim Ablegen der Transponder in die Zellkulturflaschen konnte wie im Haupt- und im Vorversuch die wachsartige Masse an den BG-Transpondern und an der Kanüle des dazugehörigen Injektionssystems festgestellt werden (siehe „3.3.4.1 Ablegen der Transponder in die Zellkulturflaschen und Zugabe der Zellen“ und „3.4.1 Vorversuch mit den fünf Transpondertypen“).

4 Ergebnisse

4.1 In-vivo-Reaktionen

4.1.1 Makroskopische Befunde

Abszess

Bei einem Transponder aus der Gruppe 1 (BG) hatte sich um den Transponder ein Abszess gebildet.

Materialablösung

Aluminiumoxyd: Bei Entnahme der Transponder aus dem Gewebe wurde oft (bei 6 von 8 Transpondern) festgestellt, dass das Oberflächenmaterial Aluminiumoxyd abgelöst und die darunter liegende Bioglaskapsel zu sehen war (Abb. 11).



Abb. 11: links: unbenutzter AL-Transponder, rechts: AL-Transponder bei Entfernung aus dem Gewebe sieben Wochen nach Implantation

Ein ähnliches Bild aber mit einer wesentlich geringeren Materialablösung zeigte sich bei wenigen (zwei von zehn) **Titantranspondern**; in diesen Fällen waren im Gewebe um den Transponder auch kleine, schiefergraue Partikel zu erkennen.

4.1.2 Anzahl der auswertbaren Präparate

Wie bereits erwähnt, fehlten von den 48 zur pathologischen Untersuchung gelieferten Mäusen bei folgenden zwei Tieren die Transponder (siehe Material und Methoden „3.2.3.2 Makroskopische Untersuchung“):

Gruppe 1 (BG) Maus 48/04

Gruppe 5 (AL) Maus 29/04

Insgesamt konnten also 46 histologische Präparate des Gewebes um die Transponder hergestellt werden.

Davon wurden drei nicht ausgewertet:

- aus Gruppe 1 (BG) wurde das Präparat mit dem Abszess nicht berücksichtigt (Maus 49/04).
- aus Gruppe 2 (PP) und Gruppe 5 (AL) konnte jeweils ein Präparat aus qualitativen Gründen nicht ausgewertet werden (Maus 6/04 und Maus 1/04)

Es ergibt sich somit folgende Verteilung der ausgewerteten Präparate:

Gruppe 1 (BG):	8 Präparate
Gruppe 2 (PP):	8 Präparate
Gruppe 3 (PA):	10 Präparate
Gruppe 4 (Ti):	10 Präparate
Gruppe 5 (AL):	7 Präparate

4.1.3 Histopathologische Befunde der Kontrollproben

Bei der Untersuchung der 48 Hautpräparate von der seitlichen Brustwand (transponderferner Bereich) wurde Folgendes festgestellt:

In der Dermis und im Unterhautfettgewebe waren in allen Proben multifokal minimal Mastzellen und eosinophile Granulozyten vorhanden (Abb. 12 und 13).

In mehreren Fällen (8 von 48) fand sich eine geringgradige, multifokale pyogranulomatöse oder mononukleäre Pannikulitis (Abb. 14).

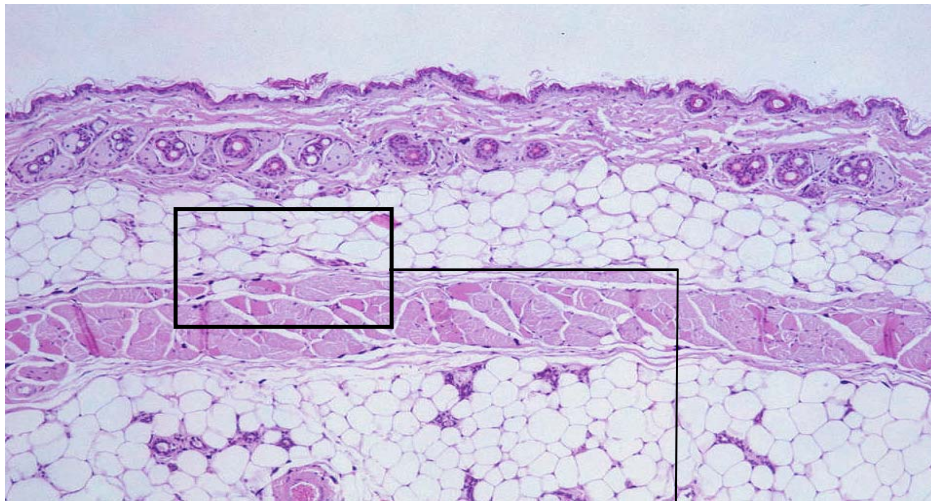


Abb. 12: Kontrollprobe von Haut (Obj.: 10x)

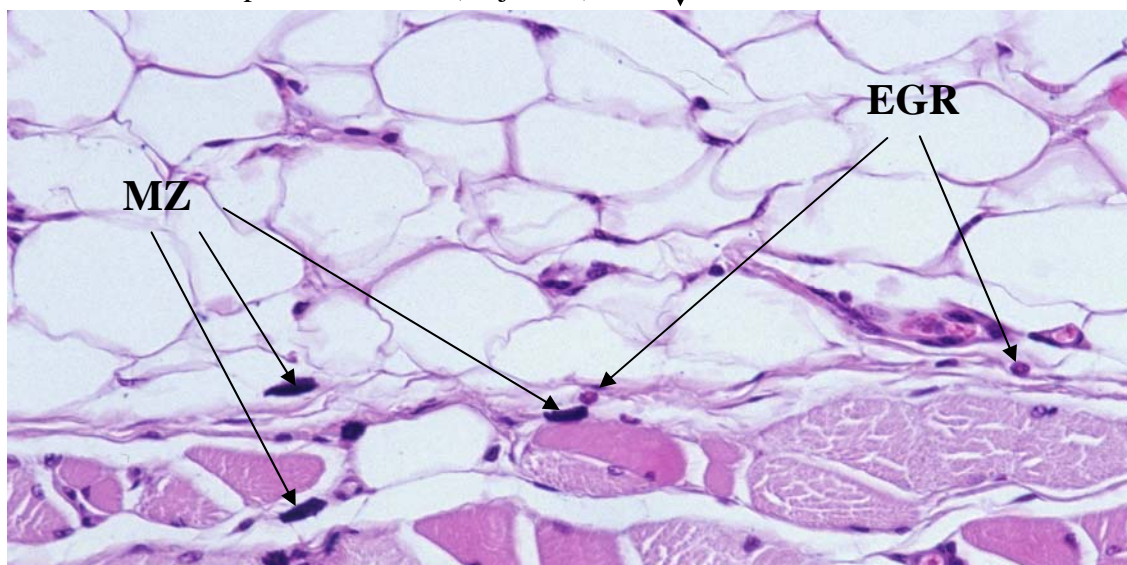


Abb. 13: Ausschnittsvergrößerung von Abb. 12, Kontrollprobe von Haut,
MZ = Mastzellen, EGR = eosinophile Granulozyten (Obj.: 40x)

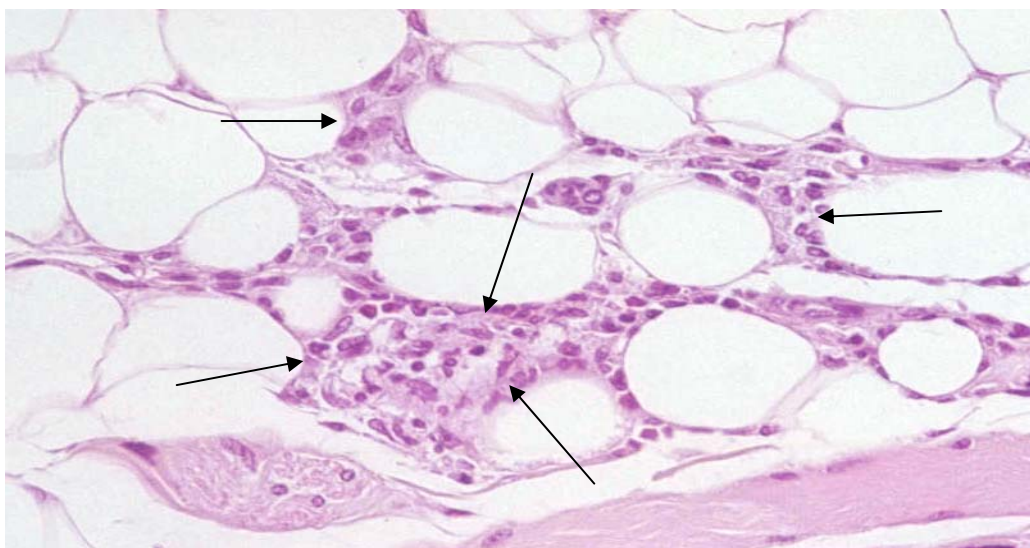


Abb. 14: Kontrollprobe von Haut: pyogranulomatöser Herd im
subkutanem Fettgewebe (Pfeile) (Obj.: 40x)

4.1.4 Histopathologische Befunde im Gewebe um die Transponder

4.1.4.1 Allgemeine Befunde und Gemeinsamkeiten

4.1.4.1.1 *Bindegewebskapsel*

Alle Transponder waren von einer **Kapsel** umgeben, die **aus kollagenen Fasern und Fibrozyten** in einer mehr oder weniger parallelen Anordnung bestand (Abb. 15 und 16).

4.1.4.1.2 *Innere Lage aus Makrophagen*

Ein weiteres Merkmal, das regelmäßig festgestellt wurde, war eine einschichtige, der Innenseite der Kapsel anliegende Lage aus Makrophagen. Z.T. fanden sich auch mehrkernige Riesenzellen (Abb. 17-19).

Diese Schicht war mehr oder weniger deutlich, d.h. bei manchen Präparaten war sie durchgehend, bei anderen waren nur Teile davon vorhanden.



Abb. 15: Übersicht Bindegewebskapsel und Gewebe um einen (entfernten) Transponder, TP=Transponderhöhle, ursprünglicher Sitz des Transponders (Obj.: 2,5x)

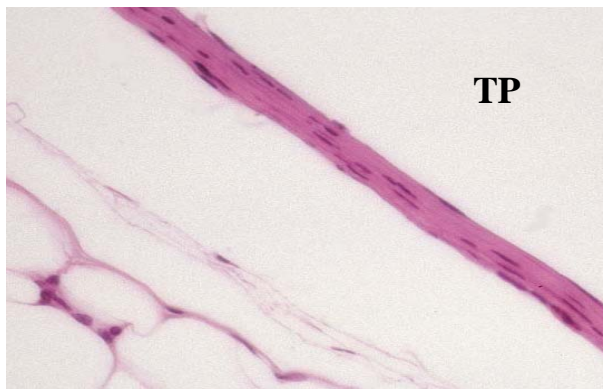


Abb. 16: Bindegewebskapsel aus parallelen Kollagenfasern und Fibrozyten; TP=Transponderhöhle (Obj.: 40x)

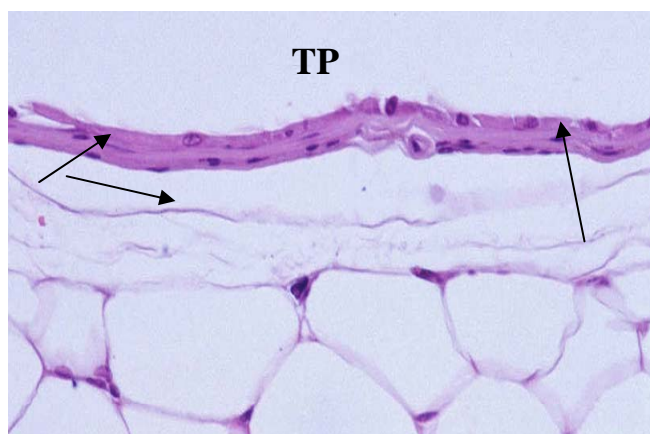


Abb. 17: Makrophagen an der Transponderseite der Kapsel (Pfeile), darunter kollagene Fasern und Fibrozyten; TP=Transponderhöhle (Obj.: 40x)

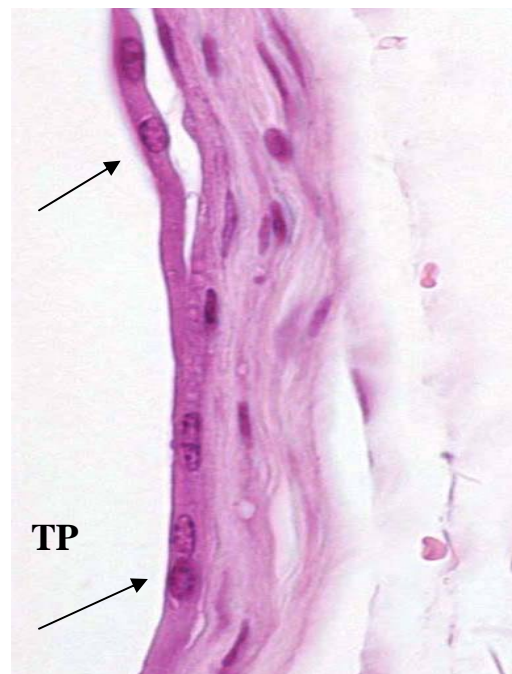


Abb. 18: Makrophagen an der Transponderseite der Kapsel (Pfeile); TP=Transponderhöhle (Obj.: 100x)

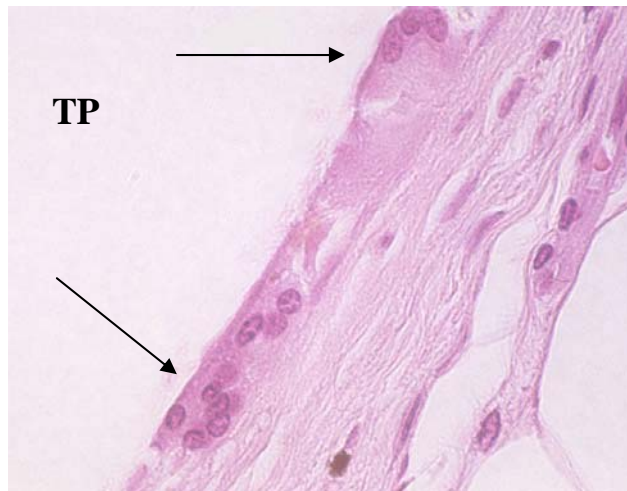


Abb. 19: mehrkernige Riesenzellen an der Transponderseite der Kapsel (Pfeile)

TP=Transponderhöhle (Obj.: 100x)

4.1.4.1.3 Kapseldicke

Hier zeigte sich ein sehr variables Ergebnis; es gab sowohl innerhalb eines Materials starke Unterschiede hinsichtlich der Kapseldicke als auch oft innerhalb eines Anschnitts (Abb. 20-22).

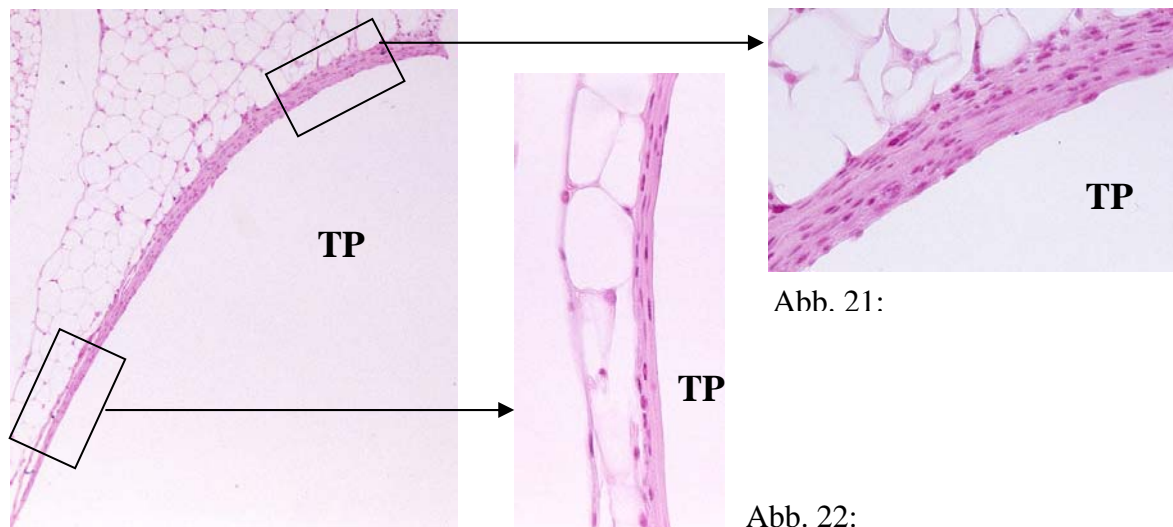


Abb. 20:

Abb. 20: Übersicht von einer Bindegewebskapsel mit verschiedenen Kapseldicken (Obj.: 10x)

Abb. 21: Ausschnittsvergrößerung von Abb. 20, dicker Kapselabschnitt (Obj.: 40x)

Abb. 22: Ausschnittsvergrößerung von Abb. 20, dünner Kapselabschnitt (Obj.: 40x)

TP=Transponderhöhle

4.1.4.1.4 Abschnitte mit nicht klassifizierbaren Zellen in der Kapsel

Ein weiterer, regelmäßiger Befund waren Abschnitte der Kapsel, die keine parallel angeordnete Faserschichtung aufwiesen, sondern aus Zellen mit einem großen blasigen Zellkern und blassem Zytoplasma bestanden. Sie ähnelten Fibroblasten. Oft waren dazwischen andere Zellen eingelagert, die von der Kernmorphologie her an neutrophile Granulozyten erinnerten. Insgesamt waren die Zellen dieser Abschnitte schwierig zu identifizieren, da keine Zellgrenzen erkennbar waren (Abb. 23).

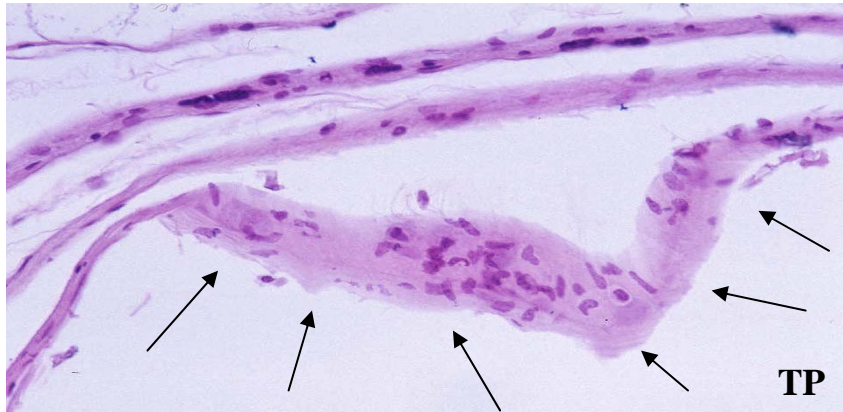


Abb. 23: Abschnitt der Kapsel mit nicht klassifizierbaren Zellen (Pfeile); TP=Transponderhöhle (Obj.: 40x)

4.1.4.1.5 Bindegewebsproliferation im Winkelbereich

Der Bereich zwischen Hautmuskel, subkutanem Fettgewebe und Bindegewebskapsel wird im Folgenden Winkelbereich genannt. Er bestand aus lockerem Bindegewebe und war unterschiedlich dick. Diese Unterschiede waren jedoch nicht materialabhängig; oft variierte die Dicke sogar innerhalb eines Präparates; teilweise fehlte der Winkelbereich vollständig (Abb. 27). Außerdem variierte die Dichte der Bindegewebsfasern im Winkelbereich. Für jede der drei Kategorien (wenig-mäßig-stark) wird hier ein typisches Beispiel als Abbildung vorgestellt (Abb. 24-26).

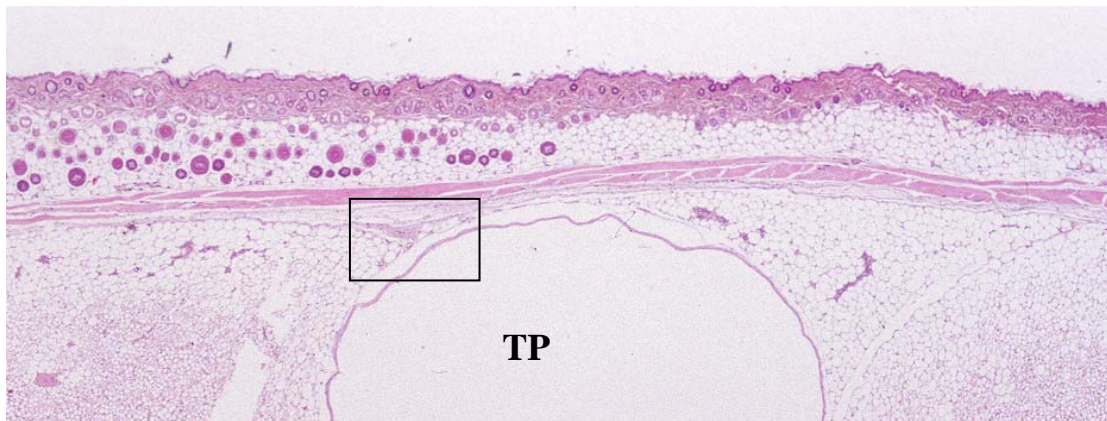


Abb. 24: Wenig Bindegewebsproliferation im Winkelbereich

TP=Transponderhöhle (Obj.: 2,5x)

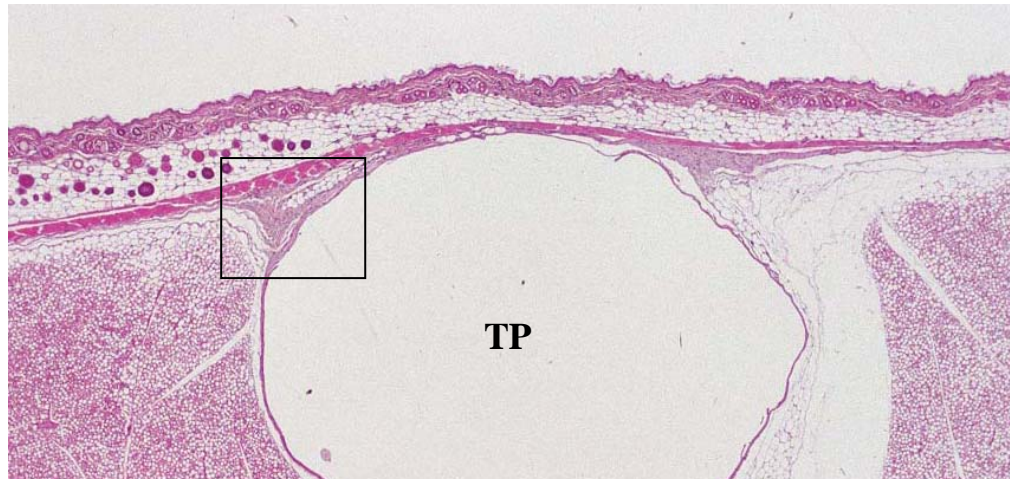


Abb. 25: Mäßige Bindegewebsproliferation im Winkelbereich;
TP=Transponderhöhle (Obj.: 2,5x)

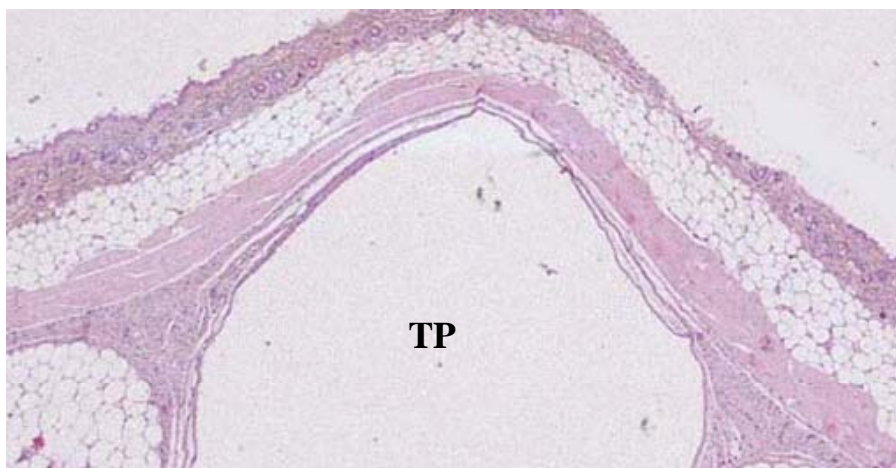


Abb. 26: Starke Bindegewebsproliferation im Winkelbereich;
TP=Transponderhöhle (Obj.: 2,5x)

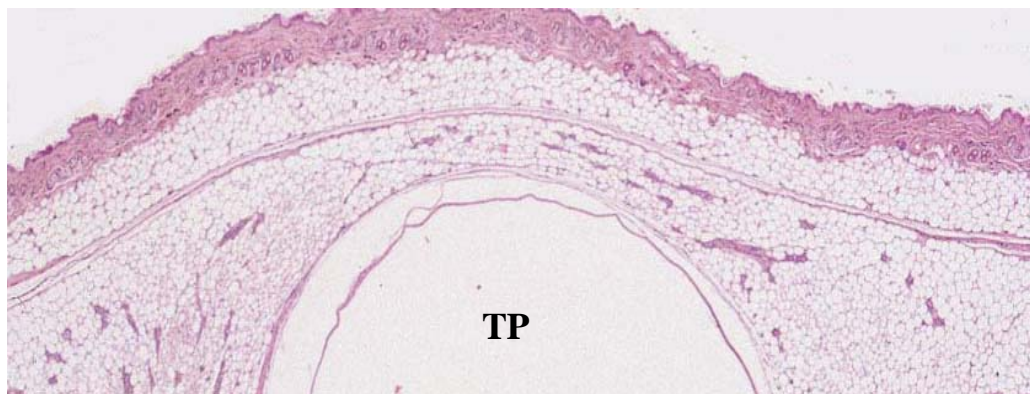


Abb. 27: Kein Winkelbereich vorhanden; TP=Transponderhöhle (Obj.: 2,5x)

4.1.4.1.6 Mastzellen und eosinophile Granulozyten in Kapsel und perikapsulärem Gewebe

Sowohl in der Kapsel als auch im perikapsulären Gewebe waren regelmäßig minimal oder geringgradig Mastzellen zu sehen (Abb. 28), während eosinophile Granulozyten regelmäßig nur im perikapsulären Gewebe zu finden waren, und dies ebenfalls in minimalem oder geringem Ausmaß. Daher wurde das Vorhandensein der beiden Zellarten bei der Auswertung nur dann angegeben, wenn die Ausprägung mehr als geringgradig war.

4.1.4.1.7 Entzündungsherde in Dermis und Subkutis

Materialunabhängig fanden sich gelegentlich (in 12 von 43 Präparaten) geringgradige multifokale eitrige, pyogranulomatöse oder mononukleäre Entzündungsherde in der Subkutis, seltener in der Dermis.

4.1.4.2 Materialspezifische Befunde

Im Folgenden werden die Ergebnisse vorgestellt, die von den allgemeinen, häufigen Befunden abwichen.

4.1.4.2.1 Bioglas

Befunde in der Kapsel

In fast allen Fällen (7 von 8) wurden multifokale Granulome um optisch leere Hohlräume bzw. Vakuolen gefunden, die vom Ausprägungsgrad her gering- bis mittelgradig waren. Die optisch leeren Hohlräume hatten Ähnlichkeiten mit Fettvakuolen. Sie waren von unterschiedlicher Größe: Als kleine Vakuolen lagen sie z.T. scheinbar reaktionslos zwischen den kollagenen Fasern, z.T. waren sie aber auch so groß, dass der Kapselaufbau dadurch unregelmäßig wurde (Abb. 33). In wenigen Fällen (2 von 8) waren die in der Kapsel vorhandenen Makrophagen in mehreren Lagen angeordnet (Abb. 30).

Daneben waren kaum andere Entzündungsreaktionen zu sehen: Selten (in 2 von 8 Fällen) fand sich abschnittsweise eine mittelgradige Häufung von eosinophilen Granulozyten mit einer minimalen Beteiligung an Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten. Einmal waren auch mittelgradig Mastzellen vorhanden.

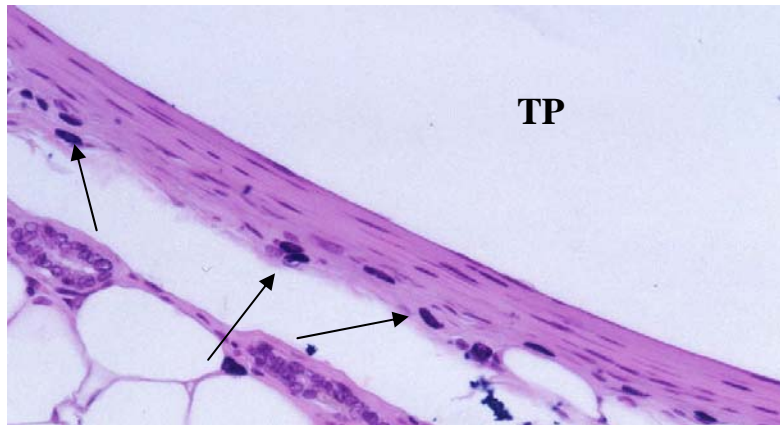


Abb. 28: Kapsel mit Mastzellen (Pfeile); TP=Transponderhöhle (Obj.: 40x)



Abb. 29: BG: hgr. granulomatöse Entzündung um optisch leere Vakuolen im Winkelbereich (Pfeile); TP=Transponderhöhle (Obj.: 10x)

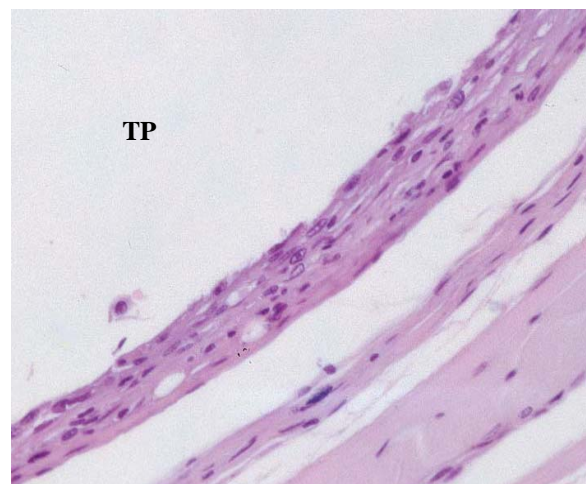


Abb. 30: BG: Kapsel mit mehreren Lagen Makrophagen; TP=Transponderhöhle (Obj.: 40x)

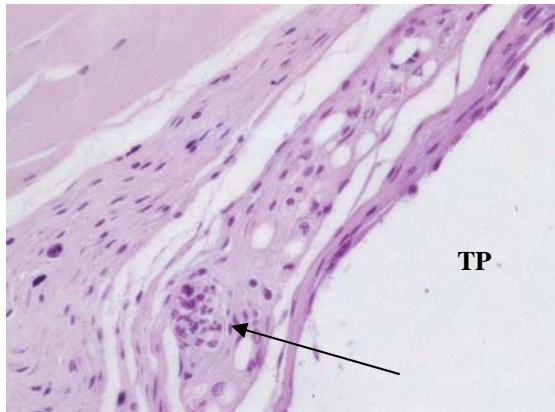


Abb. 31: BG: perikapsuläres Granulom mit optisch leeren Vakuolen und apoptotischen Strukturen (Pfeil);
TP=Transponderhöhle (Obj.: 40x)

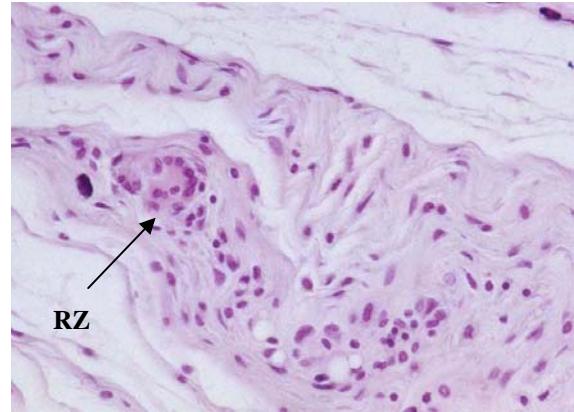


Abb. 32: BG: mehrkernige Riesenzelle (RZ) und gemischtzellige Entzündung im lockeren Bindegewebe (Obj.: 40x)

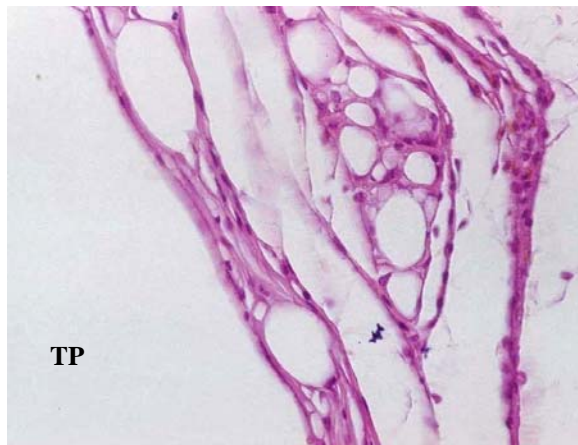


Abb. 33: BG: unregelmäßige Kapsel mit optisch leeren Vakuolen;
TP=Transponderhöhle (Obj.: 40x)

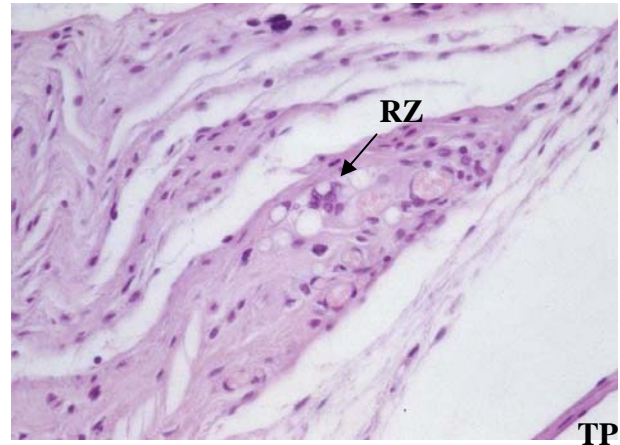


Abb. 34: BG: perikapsuläres Granulom mit optisch leeren Vakuolen, Riesenzelle (RZ) und Kapillaren; TP=Transponderhöhle (Obj.: 40x)

Befunde im perikapsulären Gewebe

In fast allen Fällen (7 von 8) war im perikapsulären Gewebe eine gering- bis mittelgradige, z.T. auch hochgradige multifokale granulomatöse Entzündung zu beobachten, die sich – wie in der Kapsel – um optisch leere Vakuolen anordnete (Abb. 29 In einem Fall umschloss das Granulom auch apoptotische Strukturen (Abb. 31 In der Hälfte der Präparate waren auch mehrkernige Riesenzellen Bestandteile der Granulome (Abb. 32 und Abb. 34).

In allen Fällen wurde zusätzlich eine minimale bis geringgradige gemischtzellige Entzündungsreaktion gefunden; neben neutrophilen Granulozyten waren oft auch eosinophile Granulozyten sowie Lymphozyten zu sehen. Letztere waren gelegentlich auch Bestandteile der Granulome (Abb. 32).

Außerdem waren gelegentlich (in 3 von 8 Fällen) fokal Kapillaren bzw. Kapillarsprossen zu erkennen sowie ein mittelgradiger Fibroblastenanteil und in zwei Fällen eine mittelgradige Beteiligung von Mastzellen.

In wenigen Fällen (2 von 8) zeigte sich eine geringgradige Hämosiderose.

Haargranulome

Minimale oder geringgradige Haargranulome waren in fast allen Fällen (7 von 8) zu sehen, sie befanden sich meistens im lockeren Bindegewebe des Winkelbereichs (siehe „4.1.4.1.5 Bindegewebsproliferation im Winkelbereich“) oder im daran angrenzenden Bindegewebe, gelegentlich auch in der Kapsel.

4.1.4.2.2 Polypropylen

Befunde in der Kapsel

Es fiel auf, dass sehr oft (in 7 von 8 Fällen) Fibroblasten Bestandteil der Kapsel waren. In 4 dieser Fälle zeigte sich außerdem eine fokale gering- bis mittelgradige Ansammlung an neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten, ferner eine nicht-parallele Anordnung der kollagenen Fasern, so dass man an diesen Stellen von einer chronischen, gering- bis mittelgradigen Granulationsgewebsbildung sprechen kann (Abb. 35 und 36, 38 und 39)

Daneben war häufig (in 4 von 8 Fällen) eine fokale und multifokale Hämosiderinablagerung zu erkennen.

Befunde im perikapsulären Gewebe

Häufig (in 5 von 8 Fällen) waren fokal und multifokal Kapillarsprossen zu sehen.

Daneben gab es wenige Auffälligkeiten, nur gelegentlich (in 2 von 8 Fällen) zeigte sich eine fokale bis multifokale geringgradige gemischtzellige Entzündungszell-Infiltration im lockeren Bindegewebe.

In wenigen Fällen (2 von 8) war eine fokale Hämosiderose zu erkennen.

Haargranulome

In vielen Fällen (5 von 8) waren in meist mittlerem Ausmaß multifokal Haargranulome zu sehen; sie befanden sich überwiegend im lockeren Bindegewebe des Winkelbereichs (siehe „4.1.4.1.5 Bindegewebsproliferation im Winkelbereich“) oder in der Kapsel (Abb. 40 und 41).

Vergleich zu den histologischen Befunden um den Bioglasteil der Polypropylen-Transponder

In den vier Präparaten, bei denen um den PP-Teil eine Granulationsgewebsbildung gefunden wurde, konnte nur in einem Fall dieser Befund auch für den Bioglasteil festgestellt werden. Ansonsten fehlte diese Entzündungsreaktion im Bioglasteil (Abb. 37).

Bei einem Präparat zeigten sich kaum Entzündungsreaktionen, und zwar um beide Teile des Transponders.

In drei weiteren Fällen war im PP-Bereich fokal eine mittelgradige Ansammlung an Fibroblasten und neutrophilen Granulozyten – in einem Präparat auch mit Lymphozyten – zu finden, die aber nicht dem typischen Aufbau eines Granulationsgewebes entsprach. Diese Auffälligkeiten fehlten im Bioglasbereich der Transponder.

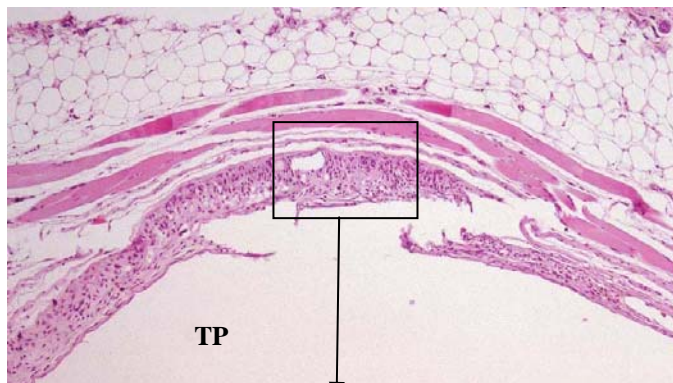


Abb. 35: PP: Kapsel mit diffuser Granulationsgewebsbildung;
TP=Transponderhöhle (Obj.: 10x)

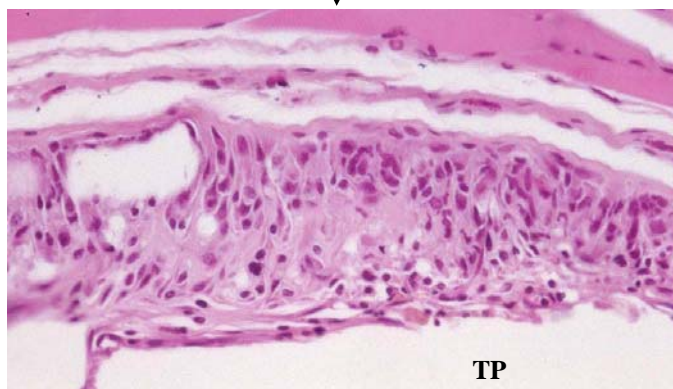


Abb. 36: PP:
Ausschnittsvergrößerung von Abb. 35, Kapsel mit diffuser Granulationsgewebsbildung;
TP=Transponderhöhle (Obj.: 40x)

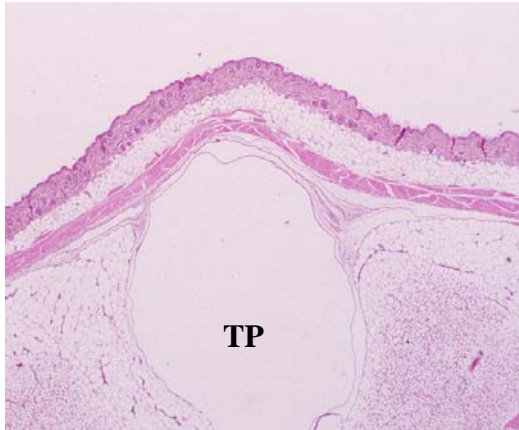


Abb. 37: PP: gleiches Präparat wie Abb. 35 und 36, Gewebe um den Bioglasteil des Transponders: kein Granulationsgewebe; TP=Transponderhöhle (Obj.: 2,5x)

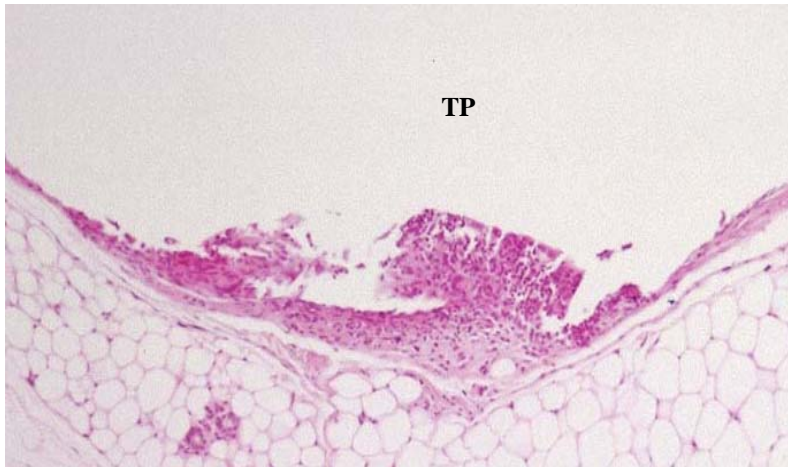


Abb. 38: PP: Kapsel mit fokalem Granulationsgewebe; TP=Transponderhöhle (Obj.: 10x)

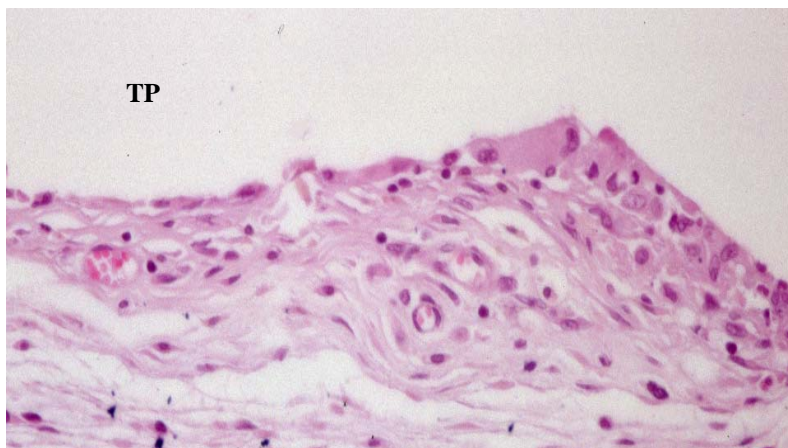


Abb. 39: PP: Kapsel und perikapsuläres Gewebe mit Granulationsgewebe; TP=Transponderhöhle (Obj.: 40x)



Abb. 40: PP: Haargranulome in Kapsel;
TP=Transponderhöhle (Obj.: 40x)



Abb. 41: PP: Haargranulome im
lockeren Bindegewebe
(Obj.: 40x)

4.1.4.2.3 *Parylene C*

Befunde in der Kapsel

Auffällig waren wenige Fälle (2 von 10) mit kleinen, transparenten Fremdkörperpartikeln, die sich im polarisierten Licht doppelbrechend darstellten. Sie waren in einem Fall umgeben von einer fokalen, geringgradigen, granulomatösen Entzündung (Abb. 42), während in dem zweiten Präparat keine Entzündungsreaktion zu sehen war.

Zusätzlich zeigte sich in einigen Präparaten (3 von 10) auch eine fokale, z.T. multifokale Hämosiderinablagerung.

Befunde im perikapsulären Gewebe

In mehreren Fällen (4 von 10) waren auch im perikapsulären Bereich transparente Fremdkörperpartikel zu sehen, die von einer geringgradigen granulomatösen Entzündung - z.T. mit mehrkernigen Riesenzellen - umgeben waren (Abb. 43). Auch diese Partikel waren im polarisierten Licht doppelbrechend und von der Größe her klein bis groß.

Weiterhin fand sich häufig (in 5 von 10 Fällen) eine geringgradige Infiltration des perikapsulären Bindegewebes mit neutrophilen Granulozyten oder mononukleären Zellen, z.T. handelte es sich aber auch um gemischtzellige Entzündungsherde.

Öfters (in 6 von 10 Fällen) konnten fokal und multifokal Kapillaren bzw. Kapillarsprossen sowie selten (2 von 10 Fälle) Fibroblasten im Bindegewebe beobachtet werden.

In wenigen Fällen (3 von 10) fand sich eine fokale Hämosiderose.

Haargranulome

Haargranulome waren multifokal minimal oder geringgradig in den meisten Fällen (8 von 10) vorhanden; oft befanden sie sich im lockeren Bindegewebe des Winkelbereichs (siehe „4.1.4.1.5 Bindegewebsproliferation im Winkelbereich“) oder in der Kapsel, gelegentlich auch im angrenzenden lockeren Bindegewebe.

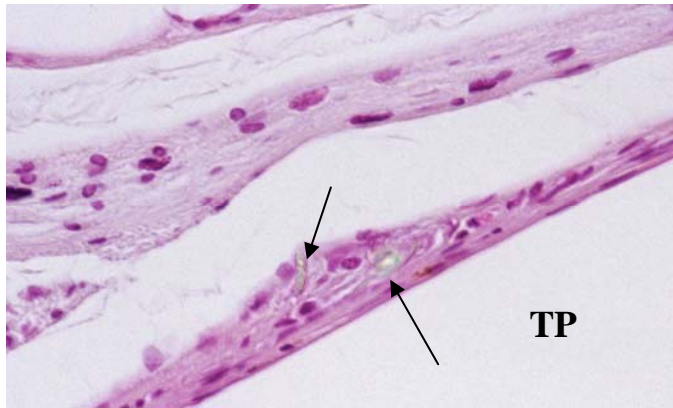


Abb. 42: PA: doppelbrechendes Fremdmaterial mit ggr. granulomatöser EZ in Kapsel (Pfeile); TP=Transponderhöhle (Obj.: 40x)

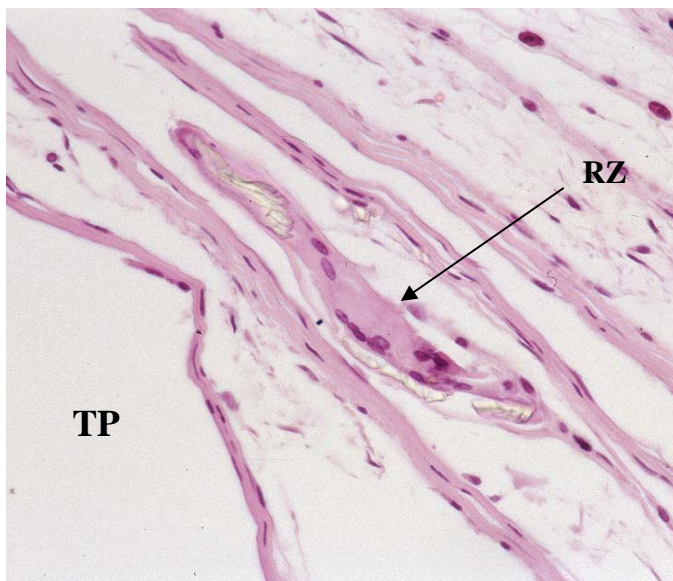


Abb. 43: PA: doppelbrechendes Fremdmaterial in mehrkerniger Riesenzelle (RZ) perikapsulär; TP=Transponderhöhle (Obj.: 40x)

4.1.4.2.4 Titan

Befunde in der Kapsel

In einigen Fällen (4 von 10) kamen kleine, schiefergraue Fremdkörperpartikel in der Kapsel vor, die von einer gering- bis mittelgradigen granulomatösen Entzündung begleitet waren (Abb. 45), z.T. aber auch reaktionslos vorlagen. Dieses Material zeigte sich im polarisierten Licht an den Rändern leicht doppelbrechend. Teilweise lagen die Partikel intrazellulär in Makrophagen (Abb. 46). Zwei dieser vier Präparate waren jene, bei denen auch makroskopisch eine geringgradige Ablösung der Titan-Oberfläche von den Transpondern zu sehen war (siehe „4.1.1. Makroskopische Befunde“).

Selten (in 2 von 10 Präparaten) waren minimal Fibroblasten am Kapselaufbau beteiligt.

Davon abgesehen stellte sich die Kapsel unauffällig dar (Abb. 44).

Befunde im perikapsulären Gewebe

Zum Teil (in 5 von 10 Fällen) fand sich eine multifokale oder diffuse minimal bis geringgradige gemischtzellige Entzündung im perikapsulären Gewebe, die überwiegend aus Makrophagen und Lymphozyten bestand. In einem Fall fanden sich auch kleine, schiefergraue Fremdkörperpartikel im Bindegewebe, die minimal von Makrophagen umgeben waren.

In einigen Fällen (4 von 10) waren multifokal Kapillarsprossen und ggr. Fibroblasten im Bindegewebe zu sehen.

Haargranulome

Minimale oder geringgradige Haargranulome waren selten (in 2 von 10 Präparaten) fokal im perikapsulären Gewebe zu sehen.

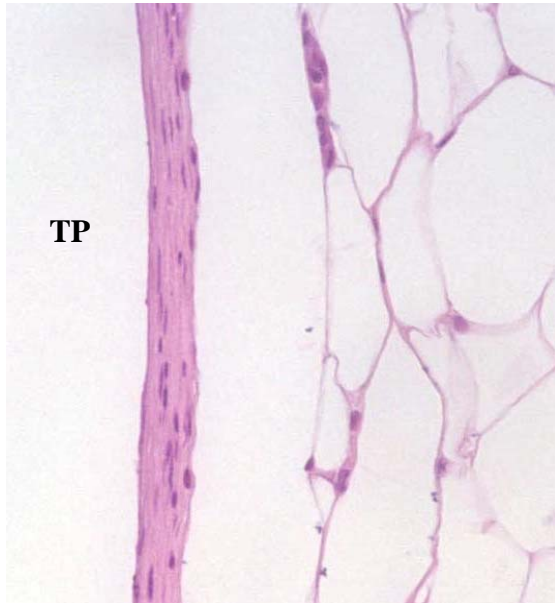


Abb. 44: Ti: Kapsel ohne EZ;
TP=Transponderhöhle (Obj.: 40x)

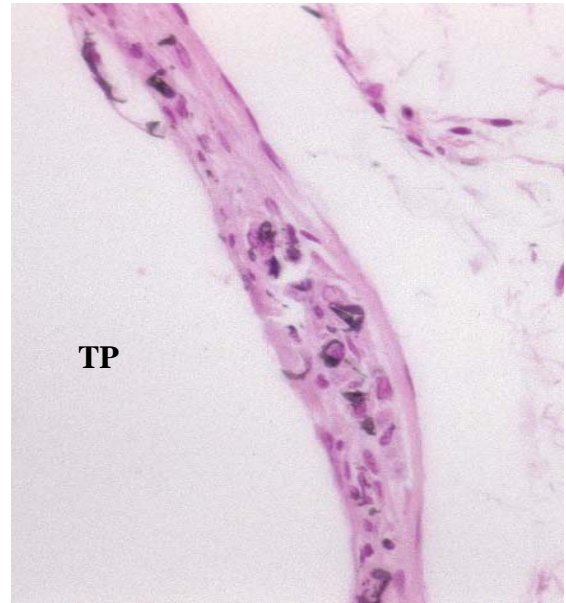


Abb. 45: Ti: Kapsel mit granulomatöser
EZ um schiefergraue Fremdpartikel;
TP=Transponderhöhle (Obj.: 40x)



Abb. 46: Ti: Fremdpartikel in einem
Makrophagen (MØ); TP=Transponderhöhle
(Obj.: 100x)

4.1.4.2.5 Aluminiumoxyd

Befunde in der Kapsel

In vielen Fällen (5 von 7) waren gering- bis mittelgradig (multi)fokal Makrophagen in der Kapsel zu sehen, gelegentlich (in 2 von 7 Fällen) auch in mehrschichtiger Anordnung (Abb. 51). In manchen Fällen (3 von 7) wurde eine gering- bis mittelgradige Beteiligung von eosinophilen Granulozyten (Abb. 49 und 50) und Lymphozyten (Abb. 51) festgestellt sowie ein gering- mittelgradiger Anteil an Fibroblasten.

Durch diese Ansammlung von Entzündungszellen erschien die Kapsel in den entsprechenden Bereichen unregelmäßig und aufgequollen (Abb. 47-49).

Selten (in 2 von 7 Fällen) war eine fokale Hämosiderinablagerung zu erkennen.

Befunde im perikapsulären Gewebe

In diesem Bereich konnten gelegentlich (in 3 von 7 Fällen) diffus oder multifokal mittel- bis hochgradig eosinophile Granulozyten und Makrophagen-Ansammlungen beobachtet werden. Außerdem war häufiger (in 4 von 7 Fällen) eine geringgradige Beteiligung von neutrophilen Granulozyten sowie in einem Fall eine fokale, geringgradige Ansammlung von Plasmazellen zu sehen. In 3 von 7 Präparaten waren jeweils in einem Anschnitt mittelgradig bis hochgradig Mastzellen vorhanden.

Meistens (bei 6 von 7 Präparaten) fanden sich multifokal Kapillaren oder Kapillarsprossen im perikapsulären Gewebe.

In einigen Fällen (4 von 7) war ein gering- bis mittelgradiges Vorkommen von Fibroblasten im Bindegewebe zu sehen.

Haargranulome

Haargranulome konnten nur in einem Fall festgestellt werden, sie befanden sich fokal in geringem Ausmaß in der Kapsel.

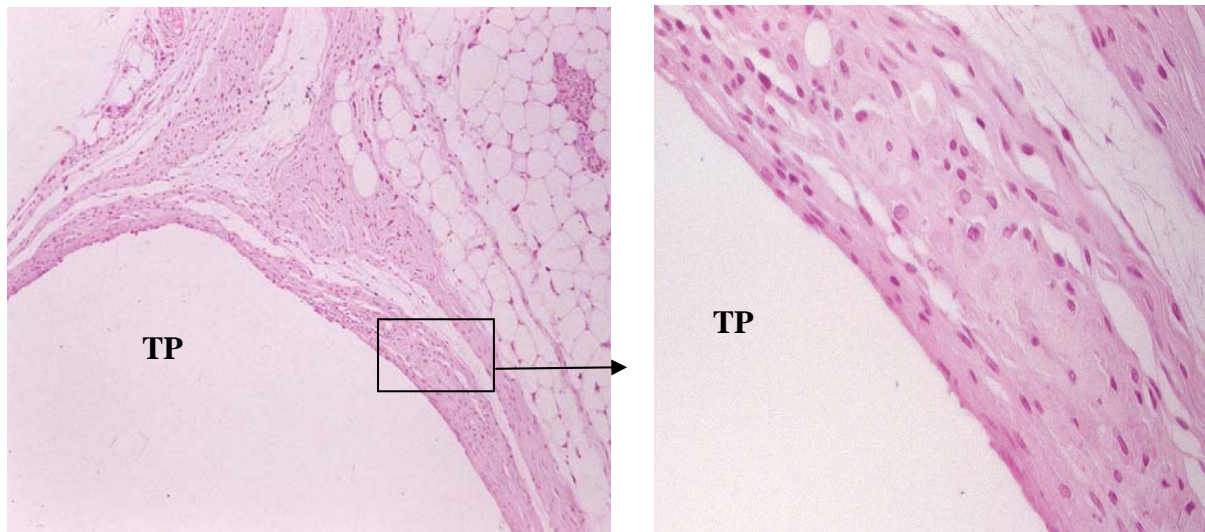


Abb. 47: AL: unregelmäßige Kapsel mit Entzündungszellen; TP=Transponderhöhle (Obj.: 10x)

Abb. 48: AL: Ausschnittsvergrößerung von Abb. 47; TP=Transponderhöhle (Obj.: 40x)

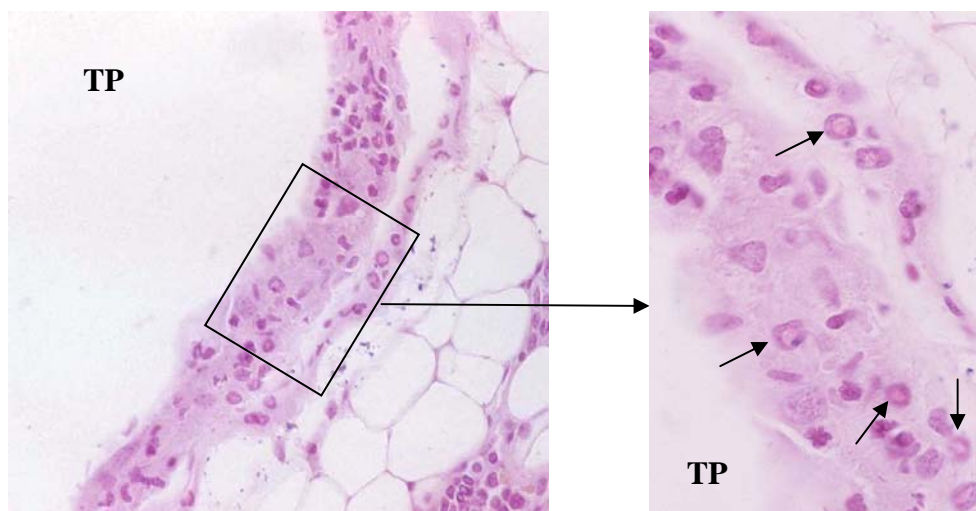


Abb. 49: AL: unregelmäßige Kapsel mit eosinophilen Granulozyten; TP=Transponderhöhle (Obj.: 40x)

Abb. 50: AL: Ausschnittsvergrößerung von Abb. 49; eosinophilen Granulozyten (Pfeile) in Kapsel; TP=Transponderhöhle (Obj.: 100x)

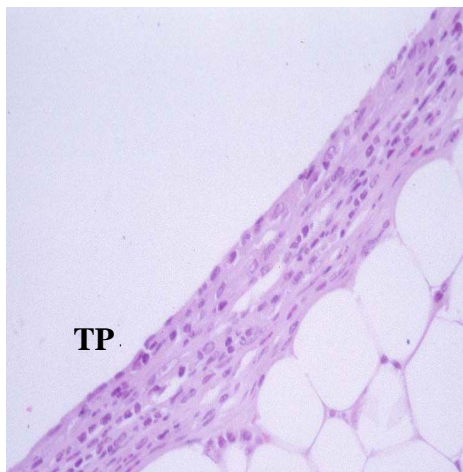


Abb. 51: AL: Kapsel mit Makrophagen und Lymphozyten; TP=Transponderhöhle (Obj.: 40x)

4.2 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von Transpondern der Mäuse

Bei der Betrachtung der Transponder fanden sich in fast allen Fällen Fasern, Zellen und Gewebereste auf der Oberfläche der Transponder. Diese waren aber nicht flächendeckend, sondern als Schollen oder Inseln angeordnet, dazwischen war die nackte Oberfläche des Transponders zu erkennen (Abb. 52-55)

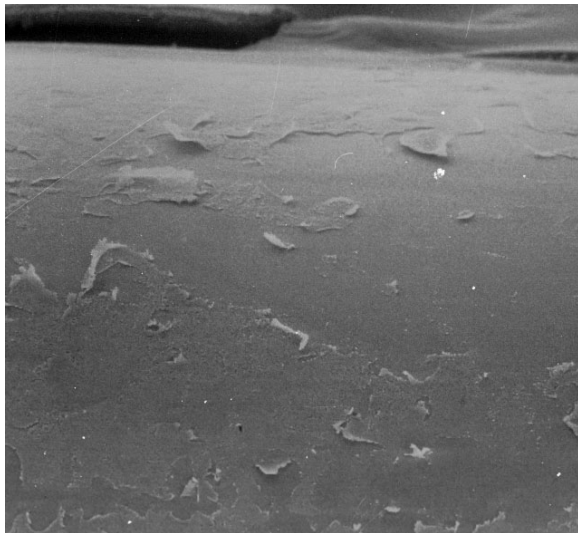


Abb. 52: BG-Transponder aus Maus mit inselartigen Gewebe- und Faserresten (REM, 100x)

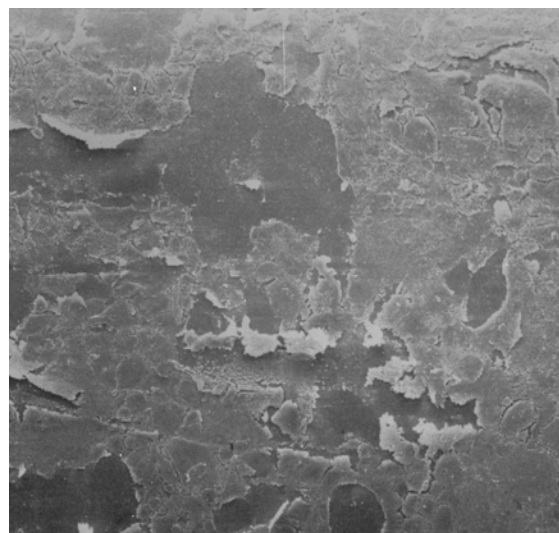


Abb. 53: AL-Transponder aus Maus mit inselartigen Gewebe- und Faserresten (REM, 100x)

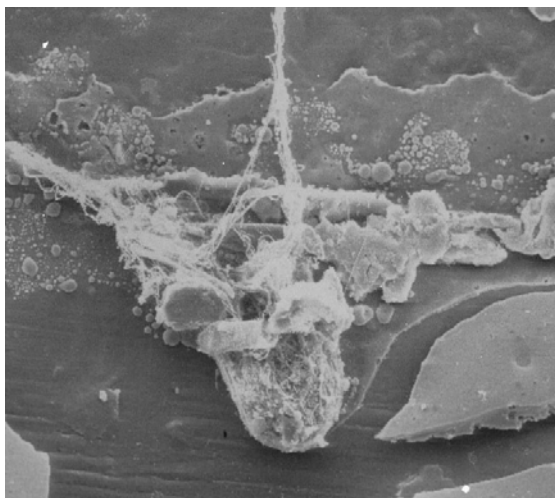


Abb. 54: PP-Transponder aus Maus mit inselartigen Gewebe- und Faserresten (REM, 200x)

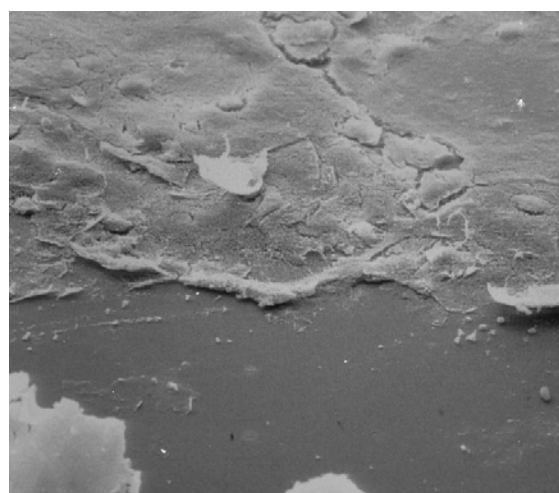


Abb. 55: Ti-Transponder aus Maus mit inselartigen Gewebe- und Faserresten (REM, 500x)

4.3 In-vitro-Reaktionen

4.3.1 Nicht auswertbare Transponder

Folgende Transponder wurden bei der Auswertung nicht weiter berücksichtigt, weil sie beim Einsetzen in das Plättchen hinunterfielen:

Zelllinie FS I: Ti_a

Zelllinie FS VI: PA_b

Insgesamt standen somit zur Auswertung zur Verfügung:

Zelllinie FS I: je Oberflächenmaterial zwei Transponder, für Titan nur ein Transponder, zusätzlich je zwei autoklavierte Titan- und Aluminiumoxyd-Transponder → insgesamt 13 Transponder

Zelllinie FS VI: je Oberflächenmaterial zwei Transponder, für Parylene C nur ein Transponder, zusätzlich je zwei autoklavierte Titan- und Aluminiumoxyd-Transponder → insgesamt 13 Transponder

4.3.2 Makroskopische Befunde

Bei der Zellkulturflasche der Linie FS I mit den Bioglas-Transpondern waren im Medium wenige weiße Schlieren zu erkennen, wodurch das Medium leicht getrübt erschien.

Alle Transponder lagen fest in ihrer ursprünglichen Position am Ende der Zellkulturflasche.

Bei Entnahme der AL- und der autoklavierten AL-Transponder aus der Zellkulturflasche wurde festgestellt, dass das Aluminiumoxyd der Transponderoberfläche größtenteils abgelöst und die darunter liegende Bioglaskapsel erkennbar war (siehe „4.1.1 Makroskopische Befunde“, Abb. 11).

4.3.3 Mikroskopische Befunde

4.3.3.1 Kontrolle

FS I

Die Dichte des Zellverbands war hoch, teilweise auch sehr hoch, und zwar auf der gesamten Fläche der Flasche, also auch am Rand (Abb. 56 und 57).

Die Zellen waren vereinzelt oder lagen in einem lockeren Verband.

Die Form der Zellen war in der Regel polygonal mit z.T. langen Zytoplasmaausläufern. Einige Zellen hatten aber auch eine spindelförmige, bipolare Form, andere waren mehrkernig (Abb. 61).

FS VI

Die Dichte des Zellverbands nach Ende der Bebrütungszeit war in den betrachteten Gesichtsfeldern mittel, wobei die Zellen in der Flaschenmitte dichter lagen (mittlere bis hohe Dichte), während sich am Flaschenrand eine geringe bis mittlere Dichte zeigte. Die Zellen waren überwiegend in einem lockeren Verband angeordnet. Die meisten hatten eine bipolare Form oder waren rundlich. Daneben gab es aber auch oft Zellen mit deutlichen Zytoplasmaausläufern und auch einige mehrkernige Riesenzellen (Abb. 58 bis 60).

Legende zu Abbildungen nächste Seite

Abb. 56: Kontrolle FS I, Mitte der Zellkulturflasche (GKM, Obj.: 10x)

Abb. 57: Kontrolle FS I, Rand der Zellkulturflasche („Fl.-Rand“), GKM, Obj.: 20x

Abb. 58: Kontrolle FS VI, Mitte der Zellkulturflasche (GKM, Obj.: 10x)

Abb. 59: Kontrolle FS VI, Rand der Zellkulturflasche („Fl.-Rand“), GKM, Obj.: 10x

Abb. 60: Kontrolle FS VI (REM, 500x)

Abb. 61: Kontrolle FS I (REM, 500x)

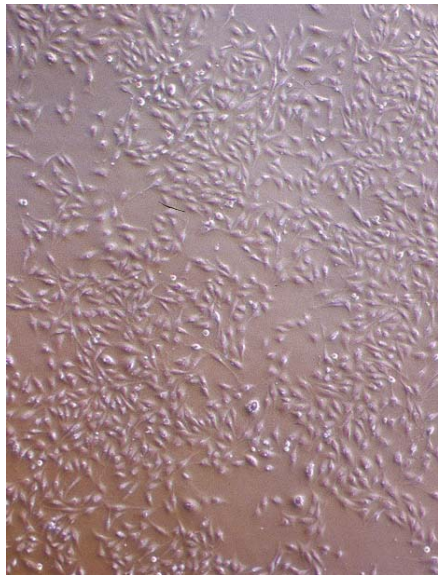


Abb. 56

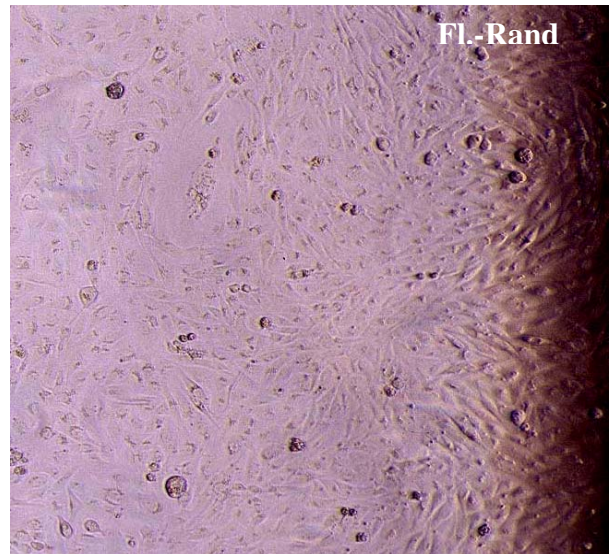


Abb. 57

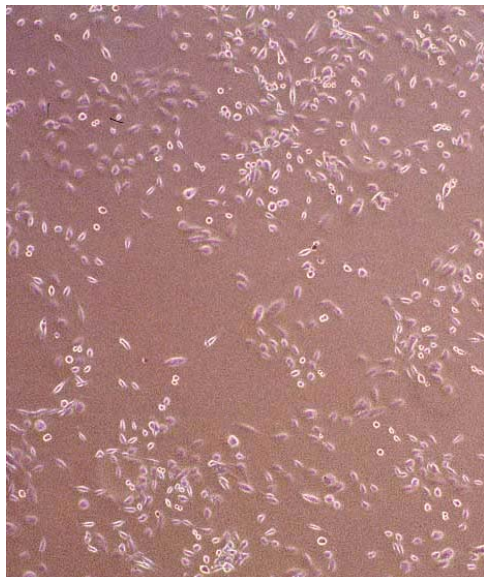


Abb. 58

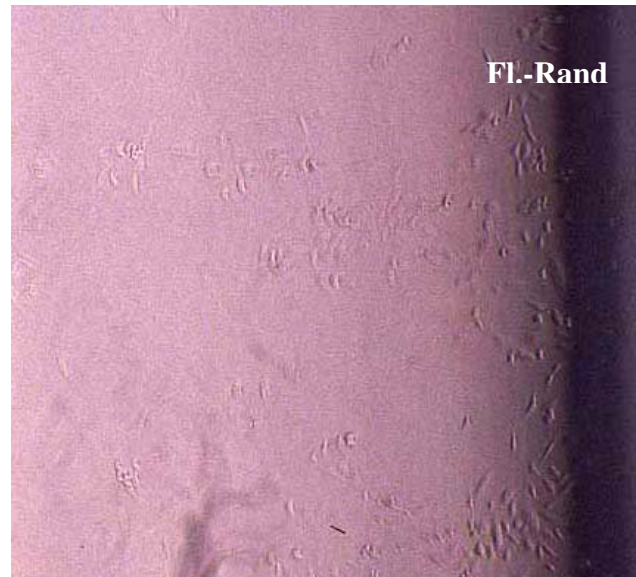


Abb. 59

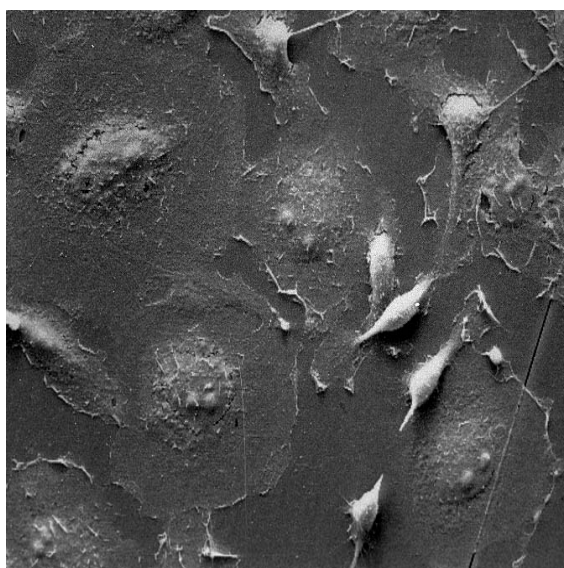


Abb.60

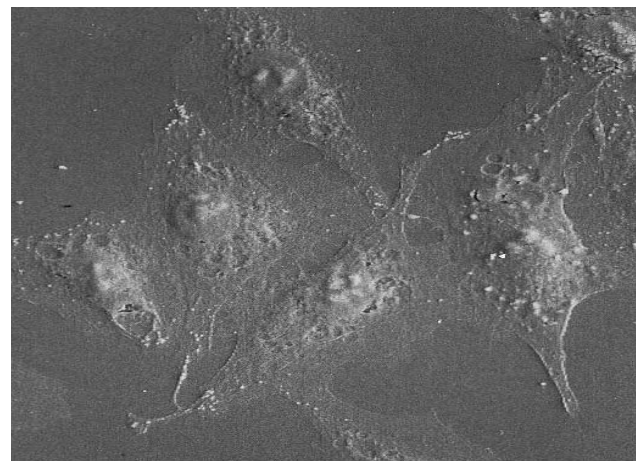


Abb. 61

4.3.3.2 Bioglas

FS I

GKM

Die Dichte des Zellverbandes war mittel bis hoch, dies galt aber nur für das vordere Drittel der Zellkulturflasche. Weiter Richtung Flaschenrand nahm die Dichte ab, und die Zellen sahen zunehmend abgerundet aus. Um die Transponder waren nur vereinzelte, abgerundete Zellen zu erkennen, so dass in den dort betrachteten Gesichtsfeldern die Dichte als minimal eingestuft wurde (Abb. 62).

REM

Auf der Oberfläche der Transponder waren Unebenheiten zu sehen, die z.T. wie kleine, aufgelagerte Bläschen erschienen, z.T. aber auch wulstartig größere Bereiche einnahmen (Abb. 63). Auf den Transpondern waren keine Zellen zu sehen.



Abb. 62: BG, FS I: minimale Dichte des Zellrasens um den Transponder, die Zellen erscheinen abgerundet (GKM, Obj.: 10x)



Abb. 63: BG, FS I: bläschenhaltige Masse, keine Zellen auf TP (REM, 100x)

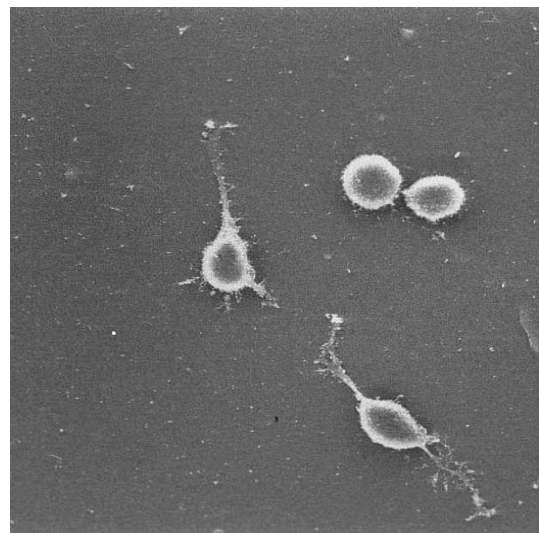


Abb. 64: BG, FS VI: geringe Zellzahl auf TP (REM, 500x)

FS VI*GKM*

Die Dichte des Zellverbandes war in etwa vergleichbar mit der Kontrolle. Richtung Flaschenrand nahm die Dichte deutlich ab, und an den Transpondern waren wenige, vereinzelte, zum größten Teil abgerundete Zellen erkennbar, d.h. die Dichte war minimal bis gering.

REM

Die Oberfläche der TP war ebener als bei der Zelllinie FS I, die dort beobachtete bläschenhaltige Masse konnte hier nicht festgestellt werden. Auf beiden Transpondern war jeweils nur an einer Stelle eine geringe Zellzahl zu sehen (Abb. 64).

4.3.3.3 Polypropylen**FS I***GKM*

Die Dichte des Zellrasens in den betrachteten Gesichtsfeldern war hoch. Die Zellen lagen meist nicht in Verbänden. Einzelne Zellen erschienen abgerundet, ansonsten war die Morphologie wie in der Kontrolle. Um den gesamten Transponder war die Dichte des Zellverbandes hoch bis sehr hoch, auch um den Bioglasteil (Abb. 65).



Abb. 65: PP, FS I: hohe bis sehr hohe Zellrasendichte um den Transponder (GKM, Obj.: 10x)

REM

Die Oberfläche der Transponder im Bereich der Polypropylenkappe wies viele Unebenheiten in Form kleiner, rundlicher, z.T. schuppiger Erhabenheiten auf (Abb. 66).

Auf dem Polypropylenteil konnten keine Zellen gefunden werden, während auf dem Bioglasabschnitt direkt unterhalb der PP-Kappe eine geringe Zellzahl vorhanden war (Abb. 67).

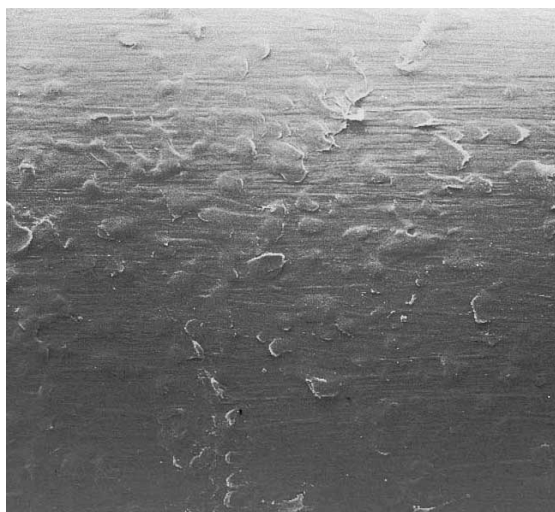


Abb. 66: PP, FS I: Unebenheiten, keine Zellen auf TP (REM, 100x)

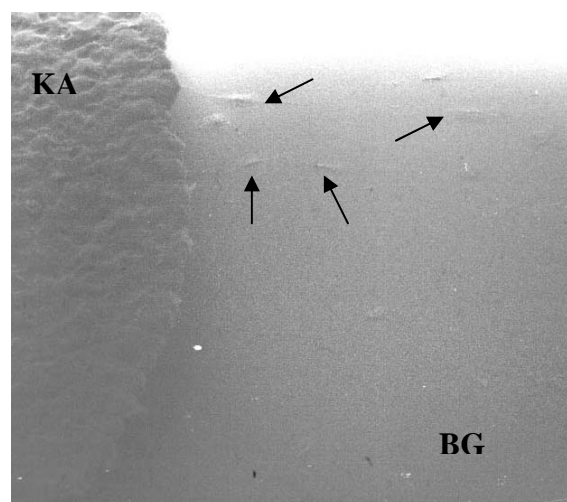


Abb. 67: PP, FS I: geringe Zellzahl (Pfeile) auf Bioglas-Abschnitt des TP (BG), KA = PP-Kappe (REM, 100x)

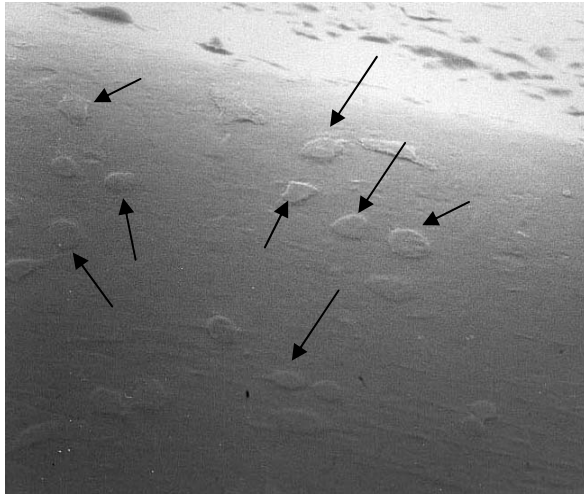


Abb. 68: PP, FS VI: mäßige Zellzahl (Pfeile) auf TP; (REM, 100x)

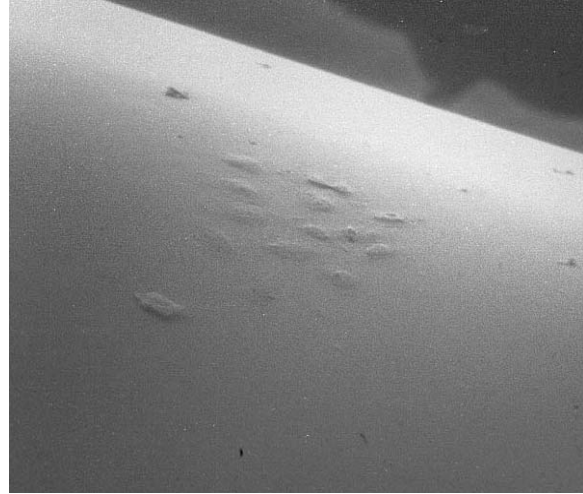


Abb. 69: PP, FS VI: Stelle mit mäßiger Zellzahl auf Bioglas-Abschnitt des TP (REM, 100x)

FS VI

GKM

Die Dichte des Zellrasens und die Zellmorphologie entsprachen der Kontrolle. Auch die Dichte in der Umgebung des Transponders war vergleichbar mit der Zellrasendichte am Flaschenrand der Kontrolle

REM

Die Oberfläche sah ähnlich aus wie bei den Transpondern aus der Zelllinie FS I. Es fanden sich von Zellen auf der PP-Kappe Ansammlung, z.T. eine nur geringe, an anderen Stellen wiederum mäßige Zellzahl (Abb. 68). Auf dem Bioglas-Abschnitt nahe der PP-Kappe fand sich an einer Stelle ebenfalls eine mäßige Zellzahl (Abb. 69).

4.3.3.4 Parylene C

FS I

GKM

Die Dichte des Zellverbandes in den betrachteten Gesichtsfeldern und die Morphologie der Zellen waren wie in der Kontrolle. Der Zellverband fand sich auch um die Transponder, war aber nicht lückenlos, so dass die Dichte mit hoch beurteilt werden kann.

REM

Die Oberfläche der Transponder war sehr uneben und bestand aus vielen kleinen tropfenartigen Erhabenheiten. Es waren Zellen auf den Transpondern vorhanden, allerdings nur in geringer Anzahl (Abb. 70 und 71).

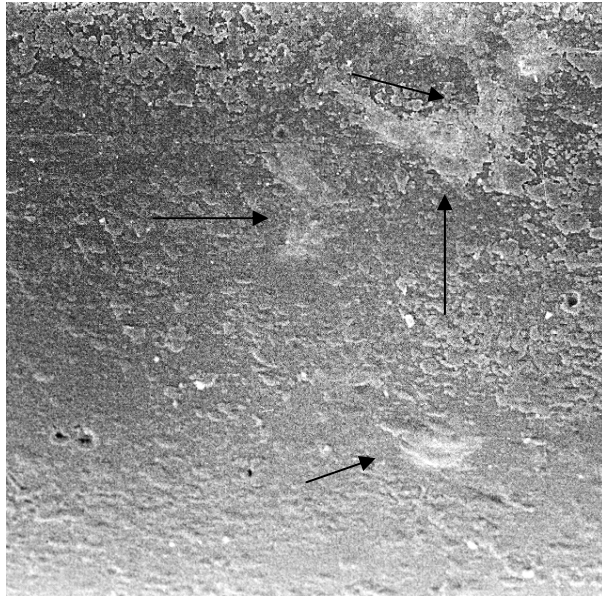


Abb. 70: PA, FS I: Unebenheiten, geringe Zellzahl auf TP (Pfeile) (REM, 200x)

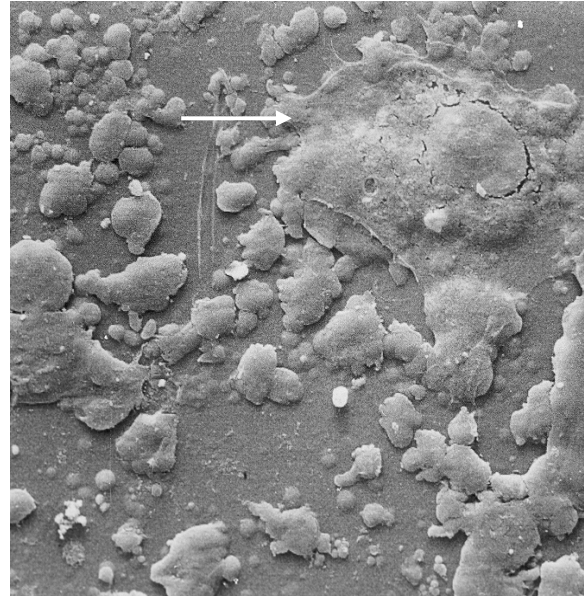


Abb. 71: PA, FS I: Unebenheiten, eine Zelle (Pfeil) auf TP (REM, 1000x)



Abb. 72: PA, FS VI: mäßige bis hohe Zellzahl auf TP (REM, 100x)

FS VI*GKM*

Die Dichte des Zellrasens und die Morphologie der Zellen waren wie in der Kontrolle, um die Transponder war die Dichte mittel bis hoch.

REM

Die Oberflächenbeschaffenheit der Transponder war ähnlich wie bei Zelllinie FS I. Die Anzahl der Zellen auf den Transpondern war eindeutig höher als bei der anderen Zelllinie, zum Teil war auch stellenweise ein Verband gebildet, so dass eine mäßig bis hohe Zellzahl vorlag (Abb. 72).

4.3.3.5 Titan

FS I

GKM

Die Zellmorphologie entsprach der Kontrolle. In den betrachteten Gesichtsfeldern zeigte sich eine hohe bis sehr hohe Dichte des Zellverbands. Diese Dichte war auch am Flaschenrand und um die Transponder zu finden. (Abb. 73). Ebenso verhielt es sich bei den autoklavierten Transpondern.

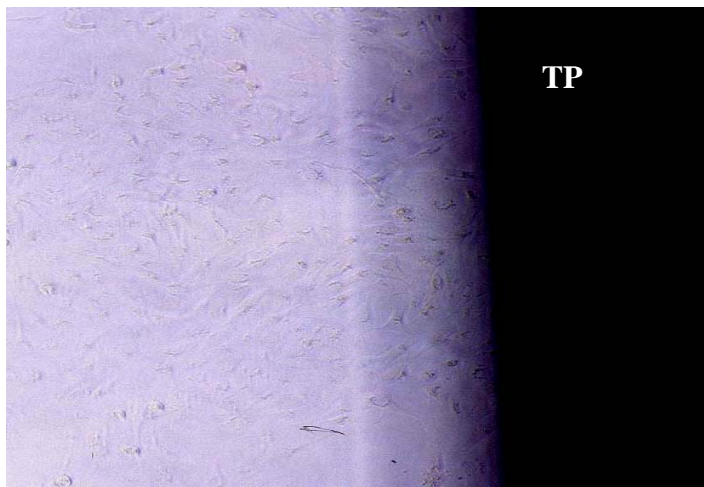


Abb. 73: Ti, FS I: hohe bis sehr hohe Dichte des Zellverbands um den Transponder (GKM, Obj.: 20x)



Abb. 74: Ti (autoklaviert), FS VI: mittlere Zellrasendichte um den Transponder (GKM, Obj.: 10x)

REM

Auf der frontalen Seite des Transponders waren sehr viele Zellen vorhanden und bildeten einen deutlichen, dichten Verband. Allerdings waren am Randbereich und seitlich des Transponders wenige Zellen zu sehen. Die Anzahl der Zellen wurde mit „hohe Zellzahl“ gewertet (Abb. 75 und 76). Auf den autoklavierten Transpondern war die Zellzahl nicht so hoch, sie wurde mit „mäßig“ bewertet (Abb. 77).

FS VI*GKM*

Die Dichte des Zellverbandes in den betrachteten Gesichtsfeldern entsprach der Kontrolle, sie war also als mittel einzustufen; um die Transponder war sie ebenfalls mittel. Auch die Zellmorphologie war vergleichbar mit der Kontrolle. Gleiches gilt auch für die autoklavierten Transponder (Abb. 74).

REM

Auf den Transpondern konnte eine niedrigere Zellzahl als bei Zelllinie FS I festgestellt werden, nämlich mäßig bis hoch (Abb. 78). Die höchste Zellzahl beschränkte sich auf den Randbereich. Auf den autoklavierten Transpondern hingegen zeigte sich eine hohe Zellzahl mit einer dichten Verbandsbildung. Die Anzahl der Zellen wird also insgesamt mit „mäßig bis hohe Zellzahl“ angegeben (Abb. 79)



Abb. 75: Ti, FS I: dichter Zellverband auf TP (REM, 100x)

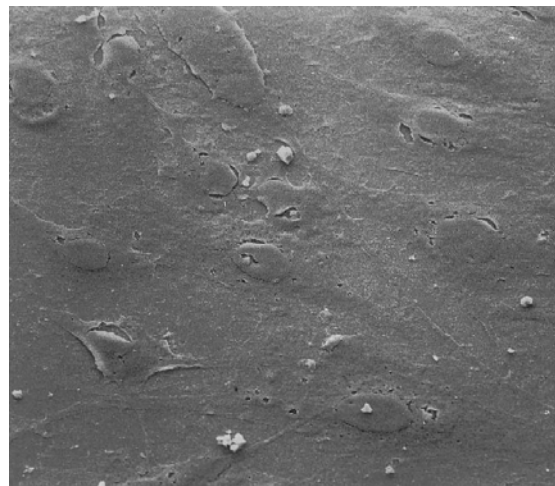


Abb. 76: Ti, FS I: Ausschnittsvergrößerung von Abb. 75, dichter Zellverband auf TP (REM, 200x)



Abb. 77: Ti (autoklaviert) FS I: mäßige Zellzahl auf TP (REM, 100x)



Abb. 78: Ti, FS VI: mäßig bis hohe Zellzahl auf TP (REM, 200x)



Abb. 79: Ti (autoklaviert) FS VI: hohe Zellzahl, deutlicher Zellverband auf TP (REM, 200x)

4.3.3.6 Aluminiumoxyd

FS I

GKM

Die Dichte des Zellverbandes in der Flaschenmitte war hoch bis sehr hoch, der Verband war hier etwas dichter als in der Kontrolle. Die Zellmorphologie entsprach der Kontrolle. Im letzten Viertel der Zellkulturflasche nahm die Dichte stark ab, und die Zellen lagen meist einzeln und waren rundlich. Um die Transponder fanden sich wenige Zellen, die Dichte wird hier also als „minimal“ bewertet (Abb. 80-83). Bei den autoklavierten Transpondern ergab sich ein ähnliches Bild.

REM

Die Oberfläche der Transponder erschien sehr porös, z.T. wie aufgeplatzt und kraterartig. Teilweise erschien sie auch unregelmäßig schollig. Es waren keine Zellen auf den Transpondern zu sehen. Das gleiche gilt auch für die autoklavierten Transponder (Abb. 85).

FS VI

GKM

Dichte des Zellrasens, Verteilung und Zellmorphologie waren wie in der Kontrolle; allerdings nahm die Dichte in Richtung Flaschenrand deutlich ab, hier waren die Zellen vermehrt abgerundet. Auch bei den autoklavierten Transpondern konnten kaum Zellen in der Umgebung der Transponder beobachtet werden (Abb. 83). Insgesamt wird die Dichte des Zellrasens um die Transponder also als „minimal“ eingestuft.

REM

Wie bei Zelllinie FS I war auch hier die Oberfläche aller Transponder sehr uneben. Es waren keine Zellen auf den Transpondern zu sehen (Abb. 84). Das gleiche gilt auch für die autoklavierten Transponder.



Abb. 80: AL, FS I: Flaschenmitte, hohe Zellrasendichte (GKM, Obj.: 10x)

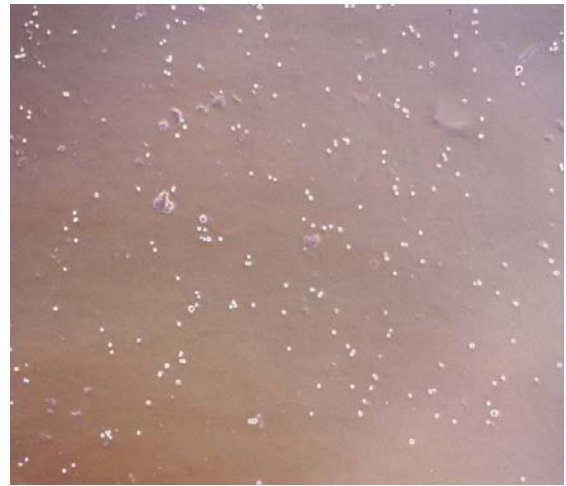


Abb. 81: AL, FS I: gleiche Zellkulturflasche wie Abb. 80, hinteres Viertel der Flasche: Zellrasendichte nimmt ab (GKM, Obj.: 10x)

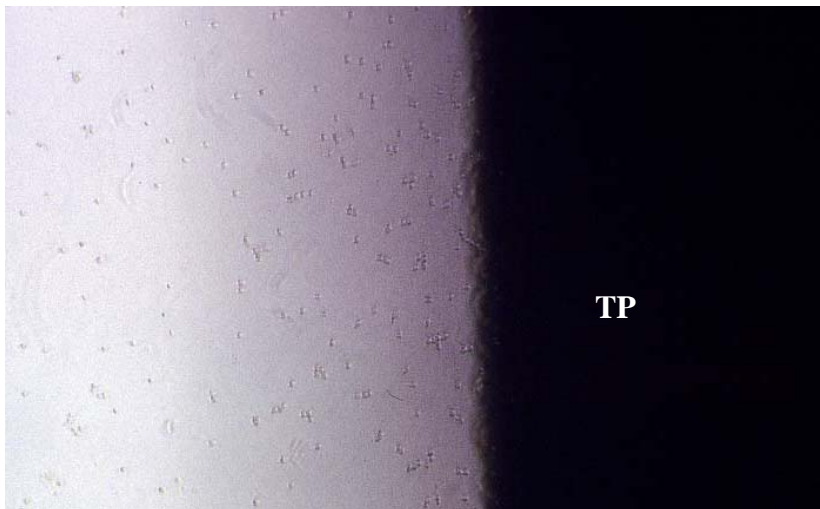


Abb. 82: AL, FS I: minimale Dichte des Zellrasens um den Transponder (GKM, Obj.: 10x)

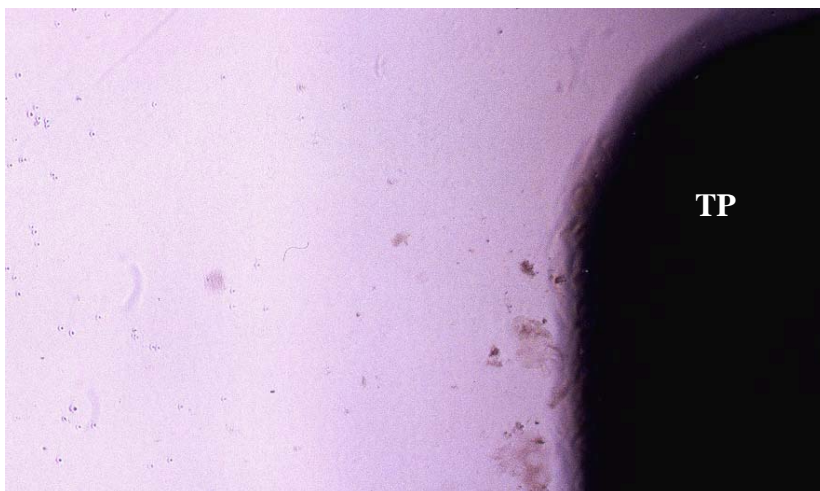


Abb. 83: AL (autoklaviert), FS VI: minimale Dichte des Zellrasens am Transponder (GKM, Obj.: 10x)

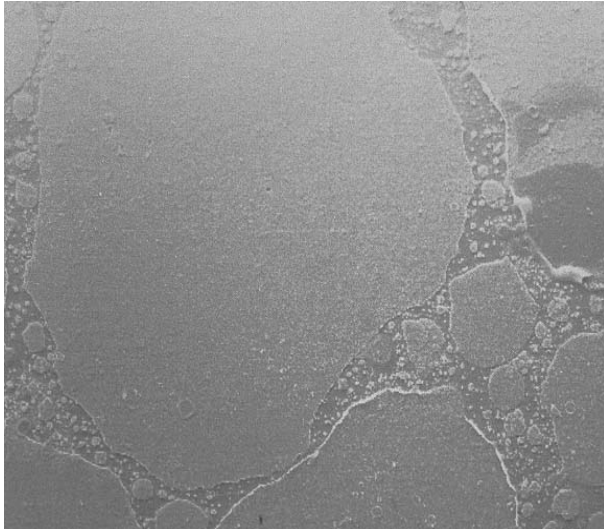


Abb. 84: AL, FS VI: unregelmäßige TP-Oberfläche, keine Zellen (REM, 200x)

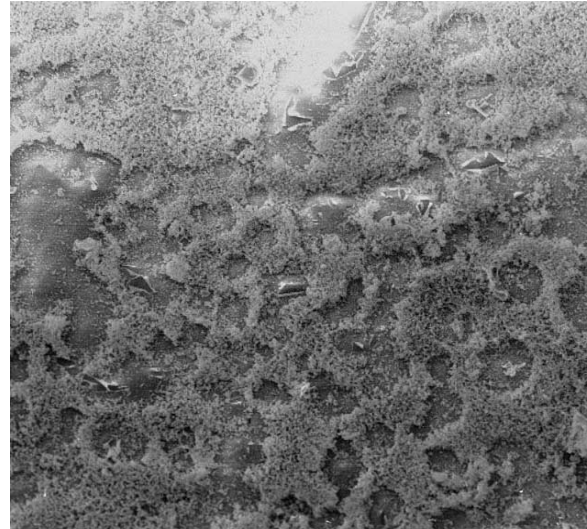


Abb. 85: AL (autoklaviert), FS I: unregelmäßige TP-Oberfläche, keine Zellen (REM, 200x)

4.4 Andere Zellkultur-Untersuchungen mit Transpondern

4.4.1 Vorversuch mit den fünf Transpondertypen

Die Ergebnisse im Vorversuch waren im Prinzip vergleichbar mit denen des Hauptversuchs. Auch hier zeigte sich bei der Betrachtung der Zellkulturflaschen im Gewebekulturmikroskop für die Transponder mit Titan-, Parylene C- und Polypropylen-Beschichtung eine hohe Zellrasendichte der Zelllinie FS I in der Umgebung der Transponder, während in der Umgebung der Bioglas- und Aluminiumoxyd-Transponder der Zellverband von minimaler oder geringer Dichte war.

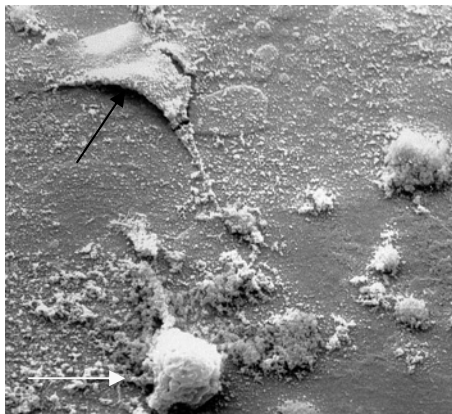


Abb. 86: Vorversuch, AL-TP (autoklaviert), FS I: geringe Zellzahl auf dem TP (Pfeile) (REM, 1000x)

Bei der Betrachtung im REM ergab sich Folgendes:

Bei den BG- und AL-Transpondern wurden wie im Hauptversuch mit der Zelllinie FS I keine Zellen gefunden; lediglich auf einem autoklavierten AL-Transponder fand sich an einer Stelle eine geringe Zellzahl (Abb. 86).

Die Oberfläche der AL-Transponder zeigte sich ebenso uneben, während die bläschendurchsetzte Masse, die auf den Bioglas-Transpondern im Hauptversuch gesehen wurde, hier nicht gefunden werden konnte.

Bei Polypropylen und Parylene C fanden sich stellenweise mehr Zellen auf den Transpondern als bei der Zelllinie FS I im Hauptversuch (Abb. 88 und 90). Ihre Anzahl wurde für beide Materialien mit „mäßig“ bewertet. Bei beiden Materialien war die Oberfläche des Transponders ebenfalls sehr uneben.

Auf den autoklavierten Titan-Transpondern war eine hohe Zellzahl vorhanden (Abb. 89).

Zum Vergleich wird auch ein Bild der Kontrolle angeführt: Abb. 87

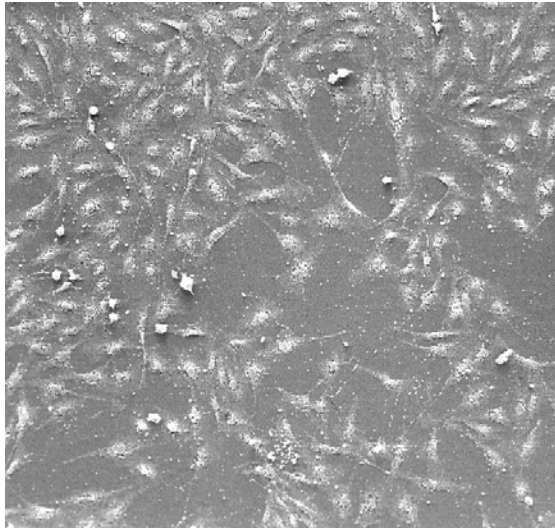


Abb. 87: Vorversuch, Kontrolle FS I
(REM, 100x)

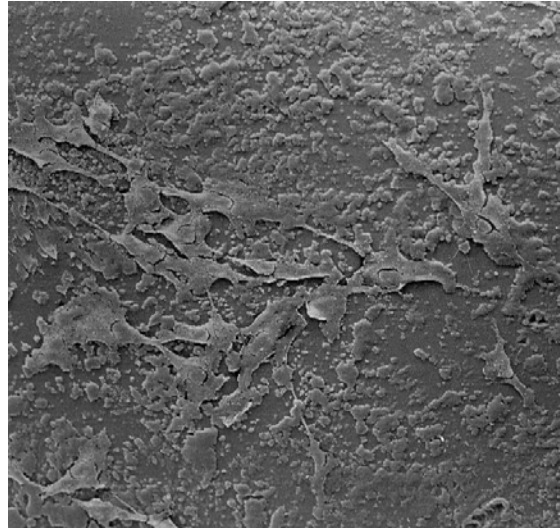


Abb. 88: Vorversuch, PA, FS I:
Stelle mit mäßiger Zellzahl auf TP (REM,
200x)



Abb. 89: Vorversuch, Ti (autoklaviert), FS I:
hohe Zellzahl, dichter Zellverband auf TP
(REM, 200x)

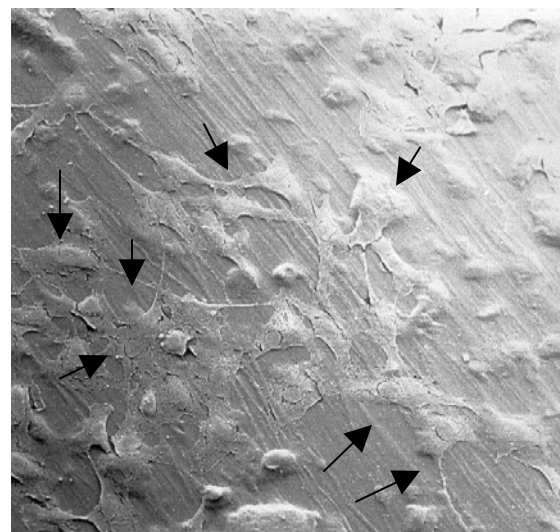


Abb. 90: Vorversuch, PP, FS I:
Unebenheiten, mäßige Zellzahl auf TP
(Pfeile) (REM, 200x)

4.4.2 Zellkultur-Untersuchung mit drei verschiedenen Bioglas-Transpondern (Versuch III)

Die Betrachtung der Zellkulturflaschen im Gewebekulturmikroskop ergab, dass für BG2 und SI die Dichte des Zellrasens in etwa mit der Kontrolle vergleichbar war. Hingegen war sie in der Umgebung der auch im Hauptversuch verwendeten BG-Transponder deutlich niedriger. Das gilt für beide Zelllinien FS I und FS VI (Abb. 91-95).

Bei der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung der Transponder konnte bei keinem der Bioglas-Transponder eine gleich hohe Zellrasendichte wie bei den Kontrollen gefunden werden; einzig bei den BG2-Transpondern fand sich stellenweise eine hohe Zellzahl. Ansonsten waren bei BG2 die Zellen nur in mäßiger Anzahl vorhanden.

Bei den SI-Transpondern fanden sich überwiegend vereinzelt liegende Zellen, nur stellenweise war die Zellzahl mit mäßig zu bewerten.

Auf den BG-Transpondern waren nur einige Stellen mit geringer Zellzahl vorhanden (Abb. 96-100).



Abb. 91: Versuch III, Kontrolle, FS I: mittlere Zellrasendichte am Flaschenrand (GKM, Obj.: 10x)



Abb. 92: Versuch III, Kontrolle FS VI: geringe bis mittlere Zellrasendichte am Flaschenrand (GKM, Obj.: 10x)

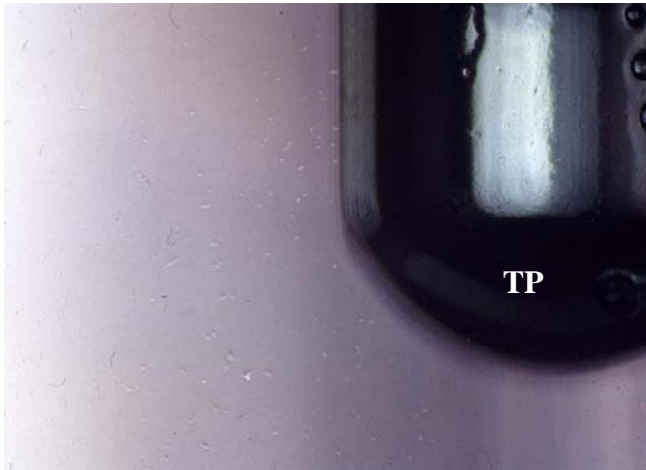


Abb. 93: Versuch III, BG, FS I: geringe Zellrasendichte um den Transponder (TP) (GKM, Obj.: 10x)



Abb. 94: Versuch III, SI, FS VI: mittlere Zellrasendichte um den Transponder (TP) (GKM, Obj.: 10x)

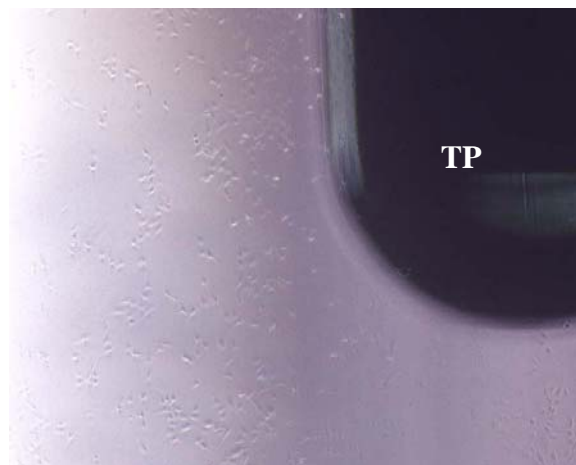


Abb. 95: Versuch III, BG2, FS I: mittlere Zellrasendichte um den Transponder (TP) (GKM, Obj.: 10x)

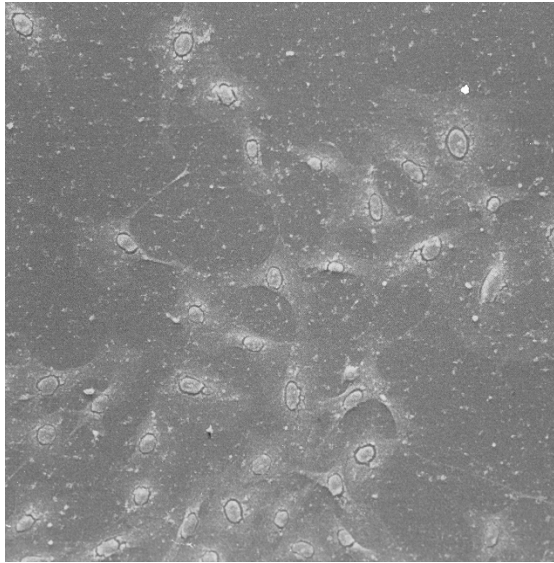


Abb. 96 Versuch III, Kontrolle, FS I (REM, 200x)



Abb. 97: Versuch III, Kontrolle, FS VI (REM, 200x)



Abb. 98: Versuch III, SI, FS VI: Stelle mit mäßiger Zellzahl auf TP (REM, 200x)

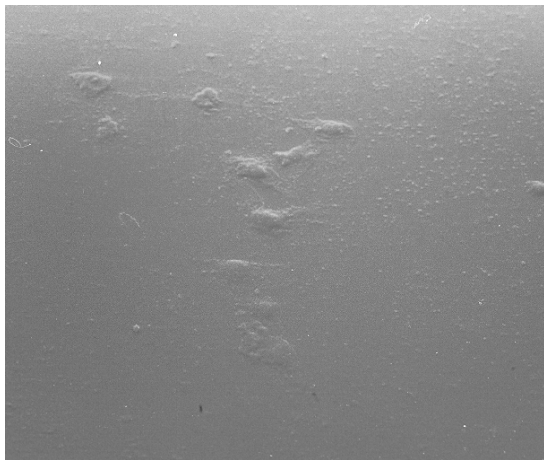


Abb. 99: Versuch III, BG, FS I: Stelle mit geringer Zellzahl auf TP (REM, 200x)

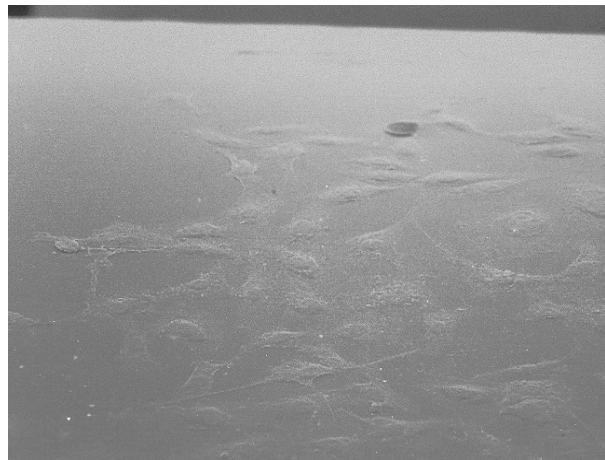


Abb. 100: Versuch III, BG2, FS I: Stelle mit hoher Zellzahl auf TP (REM, 200x)

5 Diskussion

5.1 Bemerkungen zum Aufbau und zur Auswertung der Studie

5.1.1 Beurteilung der Wanderung

In dieser Studie ging es darum, den Zusammenhang zwischen dem Oberflächenmaterial von Transpondern und der Reaktion des Gewebes bzw. von fibroblastoiden Zellkulturen zu untersuchen.

Es ging nicht darum, einen direkten Zusammenhang zwischen den Gewebsreaktionen auf die Transponder-Oberflächenmaterialien und der Migration von Transpondern aufzuzeigen.

Aus diesem Grund wurde auch nicht bewertet, ob und wie stark die Transponder bei den Mäusen gewandert waren. Wie schon eingangs erwähnt, spielen vermutlich für die Migration viele Faktoren eine Rolle, z.B. die Erfahrung und Geschicklichkeit der Person, welche die Transponder appliziert, die Bewegung des Tieres bei der Applikation, die Implantationsstelle usw. (siehe Literaturübersicht „2.5.3 Hypothesen zur Ursache der Migration“)

Damit die Wanderung der Transponder in dieser Untersuchung objektiv hätte bewertet werden können, hätte ein einheitlicher Standard geschaffen werden müssen, z.B. die gleichen Injektionssysteme und/oder ein Messprotokoll zur Erfassung der „zurückgelegten“ Distanzen. Solch eine Studie ist retrospektiv an eingesandtem Material nicht möglich. Auch wäre voraussichtlich diese Untersuchung nur an wesentlich mehr Tieren Erfolg versprechend.

5.1.2 Verwendung von Fibrosarkomzelllinien

Für den In-vitro-Teil der Studie wurden fibroblastoide Tumorzellen verwendet, die im Rahmen einer anderen Dissertation (LÖHBERG-GRÜNE et al., 2004) am Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen aus feline Fibrosarkomen isoliert und charakterisiert worden waren.

Es stellt sich die Frage, ob das Verhalten von Tumorzellen Modellcharakter für „normale“ Zellen – insbesondere Fibroblasten – im Organismus hat.

Dazu ist zu sagen, dass bei Zytotoxizitätsstudien von Biomaterialien nach ISO-Norm ebenfalls permanente Zelllinien verwendet werden, nämlich L929 Mäusefibroblasten (KAMMER et al., 2002; Webseiten Nr. 5 und 13, Aufruf Jan/Feb 2006, s. Zitate „8.2. Webseiten“).

Außerdem wurde in dieser Studie ersichtlich, dass die Fibrosarkomzellen durchaus empfindlich reagierten und teilweise ein sehr unterschiedliches Wachstum in Anwesenheit der verschiedenen Transponder zeigten.

Zudem sind die verwendeten Zelllinien am Institut für Veterinär-Pathologie etabliert und charakterisiert worden. Es ist bekannt, welche Kultivierungsbedingungen erforderlich sind und wie das normale Wachstumsverhalten aussieht.

5.2 Einfluss der In-vivo- und In-vitro-Reaktionen auf die Ortstabilität der Transponder

An dieser Stelle soll erörtert werden, inwieweit die Gewebsreaktion und die In-vitro-Reaktion auf das Oberflächenmaterial Rückschlüsse auf die Ortstabilität bzw. die Wanderung des Transponders erlauben.

Zunächst zur In-vivo-Reaktion.

Der Transponder ruft im Gewebe verschiedene Reaktionen hervor. Zunächst kommt es zu Ausbildung eines Granulationsgewebes im Sinne einer Wundheilung als Folge des Traumas durch den Implantationsvorgang. Die zweite Reaktion ist die Fremdkörperreaktion auf den Transponder selbst (siehe Literaturübersicht „2.5.4 Reaktionen im Gewebe bei Implantation des Transponders“). Weiterhin ist das Oberflächenmaterial die Eigenschaft des Transponders mit dem größten Einfluss auf die Reaktionen im Gewebe. Es ist bekannt, dass manche Materialien eine Entzündung hervorrufen können (siehe Literaturübersicht „2.5.6 Der Einfluss des Transponders auf die Vorgänge im Gewebe“).

Im Rahmen eines Entzündungsgeschehens können von den beteiligten Entzündungszellen Substanzen synthetisiert und sezerniert werden, darunter auch proteolytische Enzyme (KUMAR et al., 2005).

Es ist also vorstellbar, dass eine permanente Noxe – hier insbesondere das Transponder-Oberflächenmaterial – eine chronische Entzündung im Gewebe hervorrufen kann, welche die Freisetzung proteolytischer Enzyme und anderer Substanzen mit sich zieht. Dies wiederum könnte zu einer kontinuierlichen Auflockerung und/oder zum Abbau von umgebendem Gewebe führen, was eine Reduktion der lokalen Stabilität im Gewebe bedeuten könnte. Dadurch wäre eine Wanderung des Transponders leichter möglich, z.B. im Zusammenwirken mit der physiologischen (Haut-)Bewegung des Tieres.

LEITING et al. (2001) sahen in der Freisetzung von Zytokinen wie Interleukin-1, Interleukin-6, Tumornekrosefaktor α und Prostaglandin E_2 durch aktivierte Makrophagen eine mögliche Ursache für die aseptische Prothesenlockerung bei Osteosyntheseimplantaten.

Ein gewebeverträgliches Material ist also höchstwahrscheinlich für die Ortstabilität des Transponders wichtig und damit wünschenswert.

Nun zur Frage, wie die Ergebnisse der In-vitro-Studie zu interpretieren sind.

Woran liegt es, dass der Zellverband in Gegenwart des einen Materials dichter ist als in Gegenwart eines anderen Materials?

Als erstes ist entscheidend, ob das Material **zytotoxisch** ist. Man würde kein oder kaum Zellwachstum auf und in der Umgebung eines zytotoxischen Materials (z.B. PVC) erwarten.

Zytotoxische Wirkungen können sich auch in veränderter Zellmorphologie äußern, z.B. durch das Fehlen von Zytoplasma-Ausläufern (NEUMANN et al., 2004).

Darüber hinaus gibt es weitere chemische und physikalische Eigenschaften des Oberflächenmaterials, die das Zellwachstum beeinflussen. Bei NEUMANN et al. (2004) zeigten die Zellen ein signifikant besseres Wachstum auf poliertem Material als auf unpoliertem, also ist die **Oberflächenbeschaffenheit** ein möglicher Faktor.

Außerdem kann von Bedeutung sein, ob das Material **hydrophob oder hydrophil** ist. KAMMER et al. (2002) beschrieben, dass Mäusefibroblasten auf einem durch Trockenätzung hydrophiler gemachten Material besser wuchsen als auf dem gleichen, unbehandelten und somit hydrophoberen Material.

Die nächste Frage ist, ob und nach welchen Kriterien man die Ergebnisse in vitro auf den lebenden Organismus übertragen kann.

In vivo sind die ersten Zellen, die mit dem Transponder als Fremdkörper direkt in Kontakt kommen, Makrophagen und neutrophile Granulozyten. An den späteren Reaktionen allerdings sind Fibroblasten beteiligt - zum einen an der physiologischen Wundheilung, zum anderen an der Bindegewebs- und Kapselbildung (Kollagenfasersynthese) um den Transponder.

Wenn man die Fibrosarkomzellen aus der Zellkultur mit Fibroblasten in vivo gleichsetzt, so ist anzunehmen, dass Transponder, die in vitro gut um- und bewachsen werden, auch Fibroblasten in vivo ein förderliches Milieu bieten. So kann es zu einer unbeeinträchtigten Fibroblastenproliferation in der Umgebung des Transponders kommen, die durch

verschiedene Wachstumsfaktoren angeregt wird, welche von den Makrophagen synthetisiert werden (KUMAR et al., 2005). Im Umkehrschluss würde ein schlechtes Wachstum der Zellen *in vitro* eine Beeinträchtigung der Fibroblasten *in vivo* bedeuten. Eine verzögerte Wundheilung reduziert die Stabilität im Gewebe. Auch die Ausbildung der Bindegewebetskapsel wäre beeinflusst.

Ein zytotoxisches Material würde evtl. sogar zu Nekrosen und damit zur Entzündungsreaktion führen.

Hier kann das oben Gesagte wiederholt werden: Eine Kapselbildung ohne Entzündung in der Umgebung des Transponders fördert voraussichtlich seine Ortstabilität.

An dieser Stelle soll auch darauf eingegangen werden, welche Bedeutung die Bindegewebetskapsel im Zusammenhang mit der Migration des Transponders hat. In den bisherigen Studien wurde häufig die Überlegung geäußert, die Bindegewebetskapsel um den Transponder sei der limitierende Faktor für die Migration, d.h. sobald der Transponder eingekapselt sei, könne er nicht mehr wandern (BEHLERT und WILLMS, 1992; GABEL et al., 1988; GRUYS et al., 1993; KONERMANN, 1994; NIGGEMEYER, 1994).

Die Kapsel sollte aber als ein dynamisches Gebilde gesehen werden und nicht als starres, endgültiges Konstrukt. Es ist einleuchtend, dass von außen kommende mechanische Belastungen - wie z.B. Bewegung des Tieres und Nähe der Implantationsstelle zu harten anatomischen Strukturen - zum Umbau der Kapsel, wenn nicht sogar zu ihrem Reißen führen können und auf diese Weise eine Wanderung des Transponders (wieder) ermöglichen.

Insofern sollte die These, die Kapsel limitiere die Migration des Transponders, anders formuliert werden: Eine unkomplizierte Einkapselung, die von einer geringst möglichen Entzündungsreaktion begleitet wird, ist wünschenswert; sie ist Ausdruck der Gewebeverträglichkeit des Transponders, die – wie oben erläutert – voraussichtlich wichtig ist für seine Ortstabilität.

Um den Kreis zu schließen, ist eine unkomplizierte Einkapselung eher bei jenen Transpondern zu erwarten, die in der Zellkultur gut von Fibrosarkomzellen bewachsen werden.

Eine starke, chronische Entzündung als Reaktion auf einen Fremdkörper ist auch aus einem weiteren Grund unerwünscht: Es besteht ein Zusammenhang zwischen einer anhaltenden bzw. starken Zellproliferation bei der Entzündung im Rahmen der Fremdkörper-Reaktion und dem erhöhten Risiko der Tumorentstehung an dieser Stelle (RAO und EDMONDSON, 1990).

Bisher wurden Transponder-assoziierte Tumoren bei Ratten (ELCOCK et al., 2001) und Mäusen (BLANCHARD et al., 1999; TILLMANN et al., 1997) beobachtet, außerdem gibt es einen Fallbericht vom Hund (VASCELLARI et al., 2004).

Zuletzt sei erwähnt, dass die gute Gewebeverträglichkeit eine grundsätzliche Anforderung an Transponder ist (ANONYMUS, 1990; GRUYS et al., 1993; PIRKELMANN und KERN, 1994).

Aus den eben genannten Gründen werden die Ergebnisse dieser Arbeit vor dem Hintergrund diskutiert, dass eine wenig entzündliche Reaktion im Gewebe und eine hohe Zellzahl in der Kultur um die/auf den Transpondern sich förderlich auf die Ortstabilität auswirken sollten und somit wünschenswert sind.

5.3 Histopathologische Befunde der Kontrollproben

In allen Kontrollproben wurden in Dermis und Unterhaut multifokal minimale Ansammlungen von eosinophilen Granulozyten und Mastzellen gefunden.

In mehreren Fällen (8 von 48) fanden sich geringgradige pyogranulomatöse oder mononukleäre Entzündungsherde.

Mastzellen gehören zur normalen Zellpopulation in der Haut von Mäusen (GUDE et al., 1982; SUNDBERG, 2004). Auch eosinophile Granulozyten sind in geringer Anzahl physiologisch in der gesunden Haut der Maus (IWAMOTO et al., 1993; SUNDBERG, 2004).

Die weitergehenden Entzündungsherde in der Kontrollhaut sind mit großer Sicherheit durch kleine Verletzungen (Beißereien, Kratzen, Benagen, Fellpflege) verursacht worden. Die Kontrollproben wurden von transponderfernen Bereichen, der seitlichen Brustwand entnommen.

5.4 Interpretation allgemeiner Befunde und Gemeinsamkeiten

5.4.1 Bindegewebetskapsel und innere Makrophagenlage

In allen Fällen war die Ausbildung einer Kapsel aus kollagenen, meist parallel angeordneten Fasern und dazwischen liegenden Fibrozyten zu sehen.

Auch in bisherigen Studien wurde eine solche bindegewebige Kapsel beschrieben (BALL et al., 1991; GEISEL et al., 1998; GRUYS et al., 1993; JANSEN et al., 1999; MURASUGI et al., 2003; RAO und EDMONDSON, 1990).

Als zweiten regelmäßigen Befund fand sich eine einschichtige Lage aus Makrophagen, welche die Innenseite der Kapsel mehr oder weniger auskleidete.

Beide Charakteristika sind nach RATNER (2002) normale Bestandteile der Fremdkörper-Reaktion: Ein Implantat gelangt in den Körper. Aktivierte Makrophagen umlagern das Implantat und versuchen es zu phagozytieren. Zum Teil bilden die Makrophagen mehrkernige Riesenzellen. Der Abbau des Fremdmaterials gelingt nicht, so dass es schließlich durch Fibroblastenaktivität zu einer Abkapselung des Implantats kommt, wobei die Makrophagen weiterhin innerhalb der Kapsel liegen (Abb. 101).

IMPLANTATION:

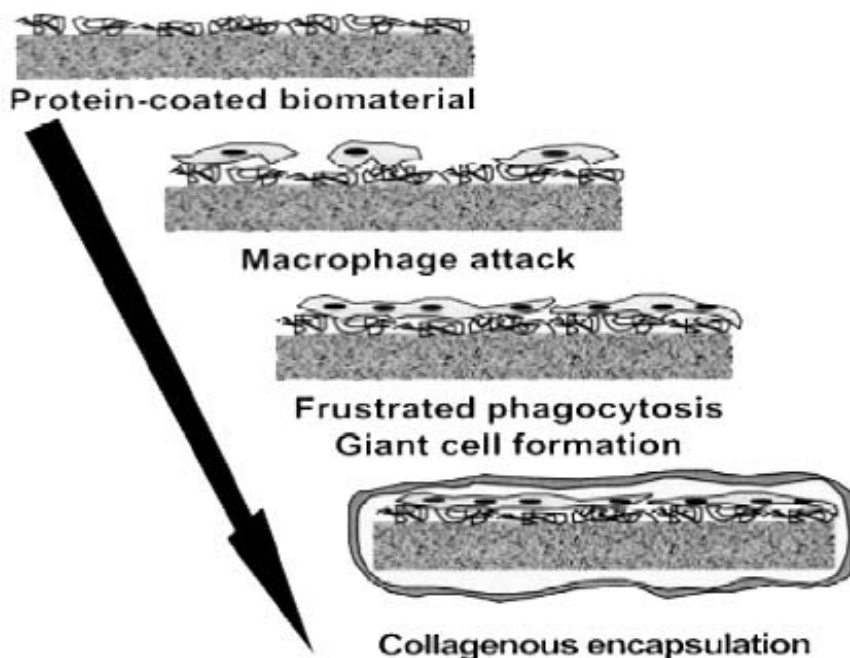


Abb. 101: Generelle Schritte der Fremdkörper-Reaktion, aus: RATNER (2002)

RATNERS Modell der Fremdkörper-Reaktion spiegelt sich in dieser Studie wider. Auch andere Autoren beschrieben eine histiozytäre Schicht an der Kontaktfläche zum Implantat (GRUYS et al., 1993; HARMS und MÄUSLE, 1979; REULING et al., 1991).

Die Tatsache, dass die innere Lage aus Makrophagen hier nicht immer bzw. nicht immer vollständig zu sehen war, ist höchstwahrscheinlich mit präparationsbedingten Verlusten bei der Entnahme des Transponders aus dem Gewebe zu erklären, denn auf den entnommenen Transpondern fanden sich im Rasterelektronenmikroskop immer Gewebsreste (siehe Ergebnisse „4.2 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von Transpondern der Mäuse“).

Die Bindegewebskapsel und die Makrophagenlage gehören also zu den normalen bzw. zu erwartenden Befunden einer Fremdkörper-Reaktion.

5.4.2 Kapseldicke

Die Dicke der Bindegewebskapsel um die Transponder wurde in einer Reihe von histopathologischen Untersuchungen bestimmt (GRUYS et al., 1993; JANSEN et al., 1999; LAMMERS et al., 1995; MURASUGI et al., 2003).

Welche Aussagekraft die Kapseldicke hinsichtlich der Gewebeverträglichkeit des Oberflächenmaterials hat, ist allerdings umstritten:

Einerseits ist bekannt, dass Implantate aus toxischem Material (z.B. PVC) im Körper eine deutlich stärkere Bindegewebskapselbildung hervorrufen als andere, gewebeverträglichere Stoffe (REULING et al., 1991). Somit wäre die Dicke ein Bewertungskriterium für die Gewebeverträglichkeit der Materialien, zumindest im Vergleich untereinander.

Andererseits konnten in anderen Studien, die sich mit der Gewebsreaktion auf Transponder beschäftigt haben, keine signifikanten Unterschiede in der Kapseldicke festgestellt werden: JANSEN et al. (1999) verglichen neben den Reaktionen auf unterschiedliche Oberflächenmaterialien auch die Reaktionen auf verschiedene Implantationsstellen und die Oberflächenbeschaffenheit von Transpondern; sie fanden nur an einer Implantationsstelle (distal des Schulterblatts) eine signifikant unterschiedliche Kapseldicke zwischen Bioglas-Transpondern mit glatter und aufgerauter Oberfläche. LAMMERS et al. (1995) dokumentierten eine starke Variation der Kapseldicke innerhalb eines Schnittes zwischen verschiedenen Messpunkten.

GRUYS et al. (1993) vermuteten, die unterschiedliche Kapseldicke könne auch mit mechanischer Stimulation von außen (Kratzen, Scheuern) zusammenhängen. Demnach wäre

die Kapseldicke kein direktes Bewertungskriterium für die Gewebeverträglichkeit des Oberflächenmaterials von bei Tieren implantierten Transpondern.

Auch in der hier vorliegenden Studie konnte kein Zusammenhang zwischen Oberflächenmaterial und Kapseldicke abgeleitet werden; sie variierte innerhalb eines Materials, zum Teil sogar innerhalb eines Präparats (siehe Ergebnisse „4.1.4.1.3 Kapseldicke“, Abb. 20-22). Diese Unterschiede innerhalb eines Präparates können vermutlich dadurch erklärt werden, dass bei Entnahme des Transponders aus dem Gewebequader geringe Reste von Bindegewebe an dem Transponder hängen blieben. Entsprechende rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen zumindest bei einem Teil der Transponder, die den Mäusen entnommen wurden, Inseln von Bindegewebsresten und/oder vereinzelt auch Zellen auf der Transponderoberfläche (siehe Ergebnisse „4.2 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von Transpondern der Mäuse“).

5.4.3 Unterscheidung zwischen komplexen Granulomen und Haargranulomen

In der Auswertung wurden Haargranulome gesondert von anderen Granulomen aufgeführt. Dies geschah, um eine granulomatöse Entzündung infolge subkutan eingebrachter Haarbestandteile von einer granulomatösen Reaktion auf den Transponder selbst zu unterscheiden. Es wäre jedoch möglich gewesen, ein Haargranulom für eine granulomatöse Entzündung anderer Ursache zu halten, wenn der Haarbestandteil nicht in der Schnittebene lag.

Die histologischen Präparate stellen zweidimensionale Schnitte durch den dreidimensionalen Gewebequader dar. Um dennoch ein möglichst repräsentatives Bild des gesamten Gewebequaders zu erhalten, wurde dieser nicht nur in mehrere Stücke zerschnitten, sondern außerdem auch von jedem Paraffinblock in der Regel mehrere Schnitte hergestellt. Nicht angeschnittene Haarbestandteile des einen Schnitts wären also mit hoher Wahrscheinlichkeit in einem anderen Schnitt erkennbar gewesen.

Durch dieses Vorgehen konnten Haargranulome relativ sicher von anderen Granulomen unterschieden werden.

5.4.4 Abschnitte mit nicht klassifizierbaren Zellen in der Kapsel

Des Öfteren war die parallele Verlaufsform der kollagenen Fasern in der Kapsel unterbrochen, und es zeigten sich Abschnitte aus Zellen mit einem großen, blasigen Zellkern und blassem Zytoplasma; sie erinnerten an Fibroblasten. Außerdem befanden sich dazwischen gelegentlich Zellen, deren Kernmorphologie an neutrophile Granulozyten erinnerte. Die genaue Identifikation war schwierig, u.a. weil die Zellgrenzen nicht zu sehen waren.

Möglicherweise handelt es sich bei diesen Abschnitten der Bindegewebskapsel um entzündliche Korrelate mit erhöhter Fibroblastenaktivität und Einwanderung von Entzündungszellen. Genauso kann es sich aber auch um mechanische (Quetsch- oder Zerr-) Artefakte handeln.

Die Identifizierung dieser Bereiche kann hier nicht befriedigend geklärt werden; da dieser Befund aber materialunabhängig auftrat, sollte ihm in dieser Untersuchung nicht zu viel Bedeutung beigemessen werden.

5.4.5 Bindegewebsproliferation im Winkelbereich

Der Winkelbereich zwischen Hautmuskelschicht, subkutanem Fettgewebe und der Bindegewebskapsel um den Transponder zeigte in den vorliegenden Fällen in der Regel eine Bindegewebsproliferation, die materialunabhängig unterschiedlich stark ausgeprägt war; zum Teil variierte der Ausprägungsgrad sogar innerhalb eines Präparats, zum Teil fehlte der Winkelbereich ganz (siehe Ergebnisse „4.1.4.1.5 Bindegewebsproliferation im Winkelbereich“).

In histologischen Studien an implantierten Transpondern wurde bisher zwar erwähnt, dass die Umgebung der straffen Bindegewebskapsel u.a. aus lockerem, gefäßreichem Bindegewebe besteht (GEISEL et al., 1998; MADER et al., 2002), dessen Ausprägung wurde jedoch nicht als Bewertungskriterium für die Gewebeverträglichkeit des Oberflächenmaterials bzw. des Transponders herangezogen.

Der Ausprägungsgrad der Bindegewebsproliferation war in dieser Studie nicht materialabhängig.

Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen Ausprägungsgrad der Bindegewebsproliferation und der Art Gewebes in unmittelbarer Umgebung des

Transponders: Der Hautmuskel wird von einer dünnen Hülle aus Bindegewebe (Epimysium) umgeben und stellt eine Grenzschrift zwischen Hautmuskel und subkutanem Fettgewebe dar. Es ist vorstellbar, dass das Epimysium Ausgangspunkt der Bindegewebsproliferation sein kann, wenn es Kontakt zum Transponder hat. Falls der Transponder aber nur von Fettgewebe umgeben ist, könnte die Bindegewebsproliferation möglicherweise geringer ausfallen oder sogar fehlen (siehe Ergebnisse „4.1.4.1.5 Bindegewebsproliferation im Winkelbereich“, Abb. 24-27).

5.4.6 Hämosiderin in Kapsel und perikapsulärem Gewebe

Bei fast allen fünf Oberflächenmaterialien (außer bei Titan) wurden in vivo fokale oder multifokale Hämosiderin-Ablagerungen in der Bindegewebskapsel und/oder dem perikapsulären Gewebe gefunden. Bei der Implantation des Transponders kam es voraussichtlich zu kleineren Blutungen im Gewebe und das Hämosiderin ist vermutlich das Abbauprodukt dieser Blutungen.

5.4.7 Mastzellen und eosinophile Granulozyten in Kapsel und perikapsulärem Gewebe

Mastzellen und eosinophile Granulozyten gehören zur normalen Zellpopulation in Haut und Unterhaut der Maus (GUDE et al., 1982; IWAMOTO et al., 1993; SUNDBERG, 2004). Auch in den Kontrollproben wurden regelmäßig Mastzellen und eosinophile Granulozyten in der Subkutis gefunden (siehe Ergebnisse „4.1.3 Histopathologische Befunde der Kontrollproben“). Aus diesem Grund wurde bei der Auswertung das Vorhandensein dieser beiden Zellarten nur dann angegeben, wenn es mehr als geringgradig war. Dies war bei Bioglas und Aluminiumoxyd von Bedeutung, wie in der weiteren Besprechung deutlich wird.

5.4.8 Entzündungsherde in Dermis und Subkutis

Die beschriebenen Entzündungsherde in der Haut kamen materialunabhängig vor; da ähnliche Herde auch öfters in den Kontrollproben auftraten, liegt der Schluss nahe, dass die Ursache nicht die Transponder sind, sondern – wie oben genannt – Manipulationen von außen wie Beißen, Benagen, Kratzen oder Fellpflege.

5.5 Interpretation der materialspezifischen Befunde

5.5.1 Bioglas

In der histologischen Untersuchung fand sich eine deutliche Tendenz zur granulomatösen Entzündung, in einer Form, die an Lipogranulome erinnerte. Diese Reaktion war oft vergesellschaftet mit einer gering- bis mittelgradigen Infiltration durch eosinophile Granulozyten und – in geringem Ausmaß – neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten.

In vitro wurde eine minimale bis geringe Zellrasendichte um die Transponder festgestellt, zudem war die Zellmorphologie verändert (meist abgerundete Zellen); auch im REM waren so gut wie keine feline Fibrosarkomzellen auf den Transpondern zu erkennen.

In beiden Versuchsteilen konnte also gezeigt werden, dass Bioglas als Oberflächenmaterial eine **ungünstige Wirkung** sowohl auf Zellkulturen als auch auf lebendes Gewebe hatte.

Dies wurde durch die Ergebnisse der beiden zusätzlichen Zellkultur-Versuchen bestätigt, da auch hier sowohl in der Umgebung der BG-Transponder als auch auf ihnen wenige Zellen bzw. eine geringe Zellrasendichte gefunden wurde (siehe Ergebnisse „4.4 Andere Zellkultur-Untersuchungen mit Transpondern“).

Eine wahrscheinliche Erklärung für diese Ergebnisse ergibt sich aus der Beobachtung bei der Ablage der Bioglas-Transponder in die Zellkulturflaschen (siehe Material und Methoden „3.3.4.1 Ablegen der Transponder in die Zellkulturflaschen und Zugabe der Zellen“): Dort konnte auf den Transpondern und an der Kanüle des Injektionssystems eine zähe, leicht wachsartige, farblose, transparente Masse erkannt werden. Diese Masse war bei allen für das In-vitro-Experiment bestimmten Bioglas-Transpondern bzw. dazugehörigen Injektionssystemen zu sehen und wurde auch bei den zusätzlichen Zellkultur-Untersuchungen gefunden (siehe Material und Methoden „3.4 Andere Zellkultur-Untersuchungen mit Transpondern“). Eine telefonische Rückfrage beim Hersteller ergab, dass es sich bei dieser Substanz um Vaseline handelte.

Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Transponder serienmäßig damit beschichtet sind und es somit auch jene Transponder waren, die den Mäusen implantiert worden waren. Die granulomatöse Reaktion wäre dann auf die Vaseline zurückzuführen.

An dieser Stelle ist auch auf Folgendes hinzuweisen: Bei den in dieser Studie verwendeten Bioglas-Transpondern mit der Polypropylenkappe (PP-Transponder) konnte auf dem

Bioglasteil makroskopisch keine derartige Substanz entdeckt werden. Bei der histologischen Untersuchung des Gewebes um diese Transponder wurden keine solchen Vakuolen mit granulomatöser Entzündung gefunden. Auch in vitro war die Zelldichte um die Transponder weder reduziert noch die Zellmorphologie verändert; es fanden sich rasterelektronenmikroskopisch sogar einige Zellen auf dem Bioglasabschnitt nahe der PP-Kappe.

Ähnliches gilt für die In-vitro-Studie mit den drei verschiedenen Bioglas-Transpondern (Versuch III, siehe Ergebnisse „4.4.2 Zellkultur-Untersuchung mit drei verschiedenen Bioglas-Transpondern“): Bei den beiden anderen Bioglas-Transpondern (BG2 und SI) wurde keine derartige Substanz gefunden und die Zellverbandsdichte um die Transponder sowie die Zellanzahl auf den Transpondern war höher als bei jenen Transpondern, auf denen diese Substanz vorhanden war (BG).

Dies unterstützt die Annahme, dass zum einen die ungünstigen Reaktionen auf die Bioglas-Transponder durch die Vaseline hervorgerufen wurden, zum anderen dass diese Beschichtung vom Hersteller abhängt.

Hier soll noch kurz auf einen weiteren Befund aus der In-vitro-Untersuchung eingegangen werden: Im Hauptversuch fielen bei der Überprüfung der Zellkulturflaschen nach Ende der Bebrütungszeit weiße Schlieren im Medium auf, die wahrscheinlich auf eine Ablösung der Vaseline während der Bebrütung zurückzuführen ist. Dieser Befund fehlte allerdings für die Zelllinie VI, obwohl auch hier beim Ablegen der Transponder in die Zellkulturflaschen die Masse auf Transpondern und Injektionssystem zu sehen war.

Dieser Unterschied lässt sich nur dadurch erklären, dass sich bei der Zelllinie FS VI während der Bebrütung weniger Vaseline von den Transpondern abgelöst hat, so dass es nicht zur Schlierenbildung kam.

Die häufige Beteiligung von eosinophilen Granulozyten kann auf eine immunstimulierende Wirkung von Vaseline hinweisen. Es ist zu berücksichtigen, dass ein geringes Maß an eosinophilen Granulozyten in der Haut der Maus normal ist (IWAMOTO et al., 1993; SUNDBERG, 2004); hier wird dieses Maß aber deutlich überschritten. Einen zusätzlichen Hinweis auf ein mögliches immunstimulierendes Geschehen stellt die in einigen Präparaten gefundene verstärkte Ansammlungen von Mastzellen dar; die Ausprägung übertraf ebenfalls das normale Maß an Mastzellen in der gesunden Haut von Mäusen (GUDE et al., 1982; SUNDBERG, 2004).

Es bleibt zu bemerken, dass die Vaseline mit großer Wahrscheinlichkeit durch die Vorbehandlungsverfahren zur Betrachtung der Transponder im REM (Propanol, Trocknung bei 40°C) zumindest teilweise abgelöst wurde. Das heißt, wenn Zellen auf diesem Material gewachsen wären, dann wären sie mit abgelöst worden. Von daher ist die Beurteilung des Zellwachstums auf diesen Transpondern nicht aussagekräftig. Die bläschenhaltige Masse, die im REM auf den BG-Transpondern der Zelllinie FS I gesehen wurde, können Reste von Vaseline sein (siehe Ergebnisse „4.3.3.2 Bioglas“). Sie fehlte allerdings bei den Transpondern der Zelllinie FS VI.

Auf der anderen Seite war bereits bei der Betrachtung der Transponder in der Zellkulturflasche unter dem Gewebekulturmikroskop eine starke Reduzierung der Zellrasendichte und eine veränderte Morphologie (Abrundung) der Zellen in unmittelbarer Umgebung der Transponder zu sehen. Das allein lässt die schon Schlussfolgerung zu, dass die Anwesenheit der BG-Transponder das Zellwachstum negativ beeinflusste.

Das Ergebnis steht im Widerspruch zu bisherigen Erfahrungen mit Bioglas-Transpondern in vergleichbaren histologischen Untersuchungen. In den meisten Fällen waren die Reaktionen unauffällig, d.h. die Bindegewebskapsel um die Transponder war frei von Entzündungszellen (JANSEN et al., 1999). Gelegentlich wurden geringgradige Entzündungsreaktionen beobachtet (GEISEL et al., 1998). Nur bei MADER et al. (2002) fanden sich in den meisten Gewebeproben Entzündungsinfiltrate in der Bindegewebskapsel um den Transponder. In keiner der genannten Studien wurde eine derart starke granulomatöse Entzündung und auch keine fettvakuolenartigen Strukturen im Zusammenhang mit Bioglas-Transpondern beschrieben. In den genannten Studien, die mit Bioglas-Transpondern bei Rindern, Schweinen, Pferden und Hunden experimentierten, wird die wachsartige Masse nicht erwähnt (GEISEL et al., 1998; GRUYS et al., 1993; JANSEN et al., 1999; MADER et al., 2002); zumindest bei JANSEN et al. (1999) und bei MADER et al. (2002) werden - wie in dieser Studie - Transponder der Firma Datamars S.A. (Bedano-Lugano, Schweiz) verwendet.

Bioglas wurde in anderen Studien als biokompatibel bezeichnet (GRUYS et al., 1993; JANSEN et al., 1999) bzw. ihm wurde eine gute Gewebeverträglichkeit bescheinigt (ANONYMUS, 1990; MADER et al., 2002). Das gilt auch für die In-vitro-Verträglichkeit (GRUYS et al., 1993; VROUWENVELDER et al., 1992).

Zusammenfassend bleibt die Feststellung, dass die verwandten Bioglas-Transponder eine ungünstige Reaktion in beiden Versuchsteilen hervorriefen, die mit großer Wahrscheinlichkeit auf die makroskopisch sichtbare Vaseline zurückzuführen ist.

5.5.2 Polypropylen

In der histopathologischen Untersuchung zeigte sich eine Tendenz zur chronischen, geringgradigen, z.T. auch mittelgradigen, multifokalen Granulationsgewebsbildung an der Kontaktfläche zum Transponder. Dabei war auffällig, dass diese Entzündungsmerkmale nicht im Bioglasteil der Transponder wieder zu finden waren; die histologischen Befunde von beiden Transponder-Teilen waren nur dann ähnlich, wenn die Entzündungsreaktion auch im PP-Bereich minimal war. Nur in einem Fall fand sich die Granulationsgewebsbildung sowohl im PP- als auch im Bioglasteil des Gewebes.

Offensichtlich führte das Polypropylen in vielen der hier untersuchten Fälle zu einer Beeinträchtigung der komplikationslosen Bindegewebskapselbildung mit der Folge einer chronischen, wenn auch meist nur fokalen Granulationsgewebsbildung. Diese Annahme wird unterstützt durch die histologischen Befunde im Gewebe um den Bioglas-Bereich der Transponder. Weitestgehend fehlte hier eine zum PP-Bereich vergleichbare Entzündungsreaktion.

An dieser Stelle muss betont werden, dass die Reaktionen geringgradig und multifokal auftraten und sich in der Regel auf die Kontaktfläche zum Transponder beschränkten, während andere Abschnitte der Kapsel keine auffälligen Reaktionen zeigten.

Die Differenzialdiagnose „reparatives Granulationsgewebe“ infolge der Gewebsdefekte durch den Implantationsvorgang kann durch den ausreichend langen Reaktionszeitraum von sieben Wochen ausgeschlossen werden.

Die Besonderheit der PP-Transponder ist, dass das Polypropylen keine vollständige Beschichtung darstellt, sondern sich als Kappe auf dem Transponder befindet. Die Kappe weist zudem zwei runde Vertiefungen auf. Die besondere Form und Struktur der Transponder können vermutlich ebenfalls einen Einfluss auf die Ergebnisse in vivo gehabt haben (siehe Literaturübersicht „2.5.6 Der Einfluss des Transponders auf die Vorgänge im Gewebe“).

In der Literatur gibt es verschiedene Angaben zur Reaktion des Gewebes auf Polypropylen-Transponder. Zum einen sagen MURASUGI et al. (2003), dass Polypropylen keine biologische Antwort hervorruft; in ihrer Studie fand sich im Gewebe von Hunden, welche PP-Transponder implantiert bekommen hatten, nach drei Monaten keine Entzündungszeichen. BALL et al. (1991) stellten in einer Studie mit Polypropylen-Transpondern bei Ratten fest,

dass nach 12 Wochen Implantationszeit histologisch außer einer dünnen Kapsel aus Bindegewebe keine Zeichen einer persistierenden Entzündungsreaktion zu sehen waren.

ARNDT und WIEDEMANN (1991) zeigten in ihrer Übersicht über die Gewebsreaktionen auf Polypropylen-Transponder, dass die Verträglichkeit bei verschiedenen Tierarten insgesamt gut war.

Auf der anderen Seite erschien JANSEN et al. (1999) die Gewebsreaktion auf die Polypropylenkappe der Transponder weniger günstig als jene auf den Bioglasteil oder auf die ebenfalls untersuchten Bioglas-Transponder; sie begründen diese Einschätzung damit, dass die Bindegewebskapsel um das PP dicker war und kleine Spalten in der PP-Kappe zu sehen waren; zusammenfassend bescheinigen die Autoren jedoch allen Transpondern ihrer Studie eine hohe Biokompatibilität; es handelte sich neben Bioglas-Transpondern mit Polypropylenkappe auch um unbeschichtete Bioglas-Transponder mit glatter und mit aufgerauter Oberfläche.

In einer anderen Untersuchung, in der ebenfalls Mäusen Transponder implantiert wurden, fanden sich keine Entzündungszeichen im Gewebe um den Glasteil der Transponder. Hingegen war der PP-Teil von einer minimalen oder milden Entzündungsreaktion mit Lymphozyten und Makrophagen sowie einigen Plasmazellen und neutrophilen Granulozyten umgeben. In zwei von über 100 Präparaten fand sich eine granulomatöse Entzündung um den PP-Teil der Transponder (RAO und EDMONDSON, 1990).

Eine Schlussfolgerung aus den Ergebnissen dieser Studie und den bisherigen, überwiegend guten Erfahrungen mit PP-Transpondern könnte sein, dass es tierartspezifische Unterschiede in der Gewebereaktion auf Polypropylen bzw. die besondere Struktur der Kappe gibt.

Weiterhin fiel auf, dass bei diesen Transpondern die Anzahl der Haareinschlüsse höher war als bei den anderen Materialien und dadurch auch die sekundäre granulomatöse Reaktion (Haargranulome) stärker ausfiel.

Haargranulome wurden in dieser Studie bei jedem der fünf Oberflächenmaterialien im Gewebe um die Transponder gefunden wurden. Auch in anderen Transponder-Studien waren Haargranulome ein histologischer Befund (BALL et al., 1991; GRUYS et al., 1993).

Mögliche Ursachen für das Einbringen von Haarbestandteilen in tiefere Hautschichten sind z.B. Kratzen, Belecken und Benagen der Haut oder auch die Verabreichung von Injektionen (MULLER et al., 2001). Der Organismus reagiert normalerweise mit einer Fremdkörper-Entzündung (MULLER et al., 2001).

Hier liegt die Vermutung nahe, dass die Haarbestandteile durch den Implantationsvorgang in die tieferen Hautschichten transportiert wurden, auch wenn nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann, dass andere Ursachen eine Rolle gespielt haben.

Der stärkere Ausprägungsgrad der Haargranulome bei den PP-Transpondern kann möglicherweise auf die großlumigere Kanüle des Injektionssystems zurückgeführt werden; der Durchmesser der Kanülen für PP-Transponder betrug 3,0 mm und damit 0,4 mm mehr als bei den anderen Injektionssystemen.

Bei der In-vitro-Untersuchung zeigten sich im Hauptversuch bei der Zelllinie FS I keine Zellen auf dem PP-Teil der Transponder, während bei Zelllinie FS VI und im Vorversuch eine mäßige Anzahl an Zellen auf den Transpondern vorhanden war. In beiden Versuchen war die Dichte des Zellrasens um die Transponder vergleichbar mit den Kontrollen. Auf dem Bioglasteil der Transponder war fokal eine geringe (FS I) oder mäßige (FS VI) Zellzahl zu sehen. Rasterelektronenmikroskopisch fiel weiterhin auf, dass die Oberfläche der Transponder viele Unebenheiten in Form von schuppigen Erhabenheiten aufwies.

In der Zellkultur ist Polypropylen ein etabliertes Material für Kulturgefäße; es ist weder zytotoxisch noch sollte es die Adhäsion von Zellen beeinträchtigen (LINDL, 2000).

Eine mögliche Begründung für die nur mäßige Zellzahl auf den Transpondern ist die unregelmäßige Oberflächenbeschaffenheit. Weiterhin ist unbekannt, ob das für die Transponder verwendete Polypropylen ebenso hydrophil ist wie jenes, das für Zellkulturflaschen verwendet wird. Hydrophile Materialien ermöglichen eine bessere Zelladhäsion als hydrophobe (siehe „5.2 Einfluss der In-vivo- und In-vitro-Reaktionen auf die Ortstabilität der Transponder“). Dieser Punkt könnte eine weitere Erklärung für die nur mäßige Zellzahl auf den Transpondern sein.

Die Ergebnisse für Polypropylen werden also in beiden Versuchsteilen insgesamt als intermediär beurteilt.

5.5.3 Parylene C

In der In-vivo-Untersuchung fanden sich nach Implantation von Parylene C-beschichteten Transpondern in einigen Fällen Fremdkörpereinschlüsse mit einem transparenten, doppelbrechenden Material, das meist von einer minimalen bis geringgradigen fokalen granulomatösen Entzündung begleitet war.

Ansonsten war die Kapsel in der Regel ohne Entzündungszeichen, im perikapsulären Gewebe fand sich gelegentlich eine geringgradige gemischtzellige Entzündungsreaktion.

Parylene C wird als stabiles, abriebfestes Material beschrieben (Webseite Nr. 12, Aufruf Jan/Feb 2006, s. Zitate „8.2. Webseiten“). Es scheint auch keine Materialveränderungen von Parylene C in biologischen Systemen zu geben. Allerdings existieren Berichte über belastungsbedingte Risse und Oberflächenkrater, sogenanntes „pinholing“ (Webseite Nr. 11, Aufruf Jan/Feb 2006, s. Zitate „8.2. Webseiten“). Darüber hinaus kann es auch herstellungsbedingt beim Beschichtungsvorgang zu Unregelmäßigkeiten auf der Oberfläche bzw. zu geringfügigen Ablagerungen loser Partikel kommen (VOSS, 2005). Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den Einschlüssen um Parylene C-Fragmente handelt.

In vitro war um die Transponder bei der Zelllinie FS I eine hohe und bei FS VI eine mittlere Zellverbandsdichte zu sehen; beides entsprach in etwa der Zellverbandsdichte der jeweiligen Kontrollen. Allerdings zeigte sich auf den Transpondern nur bei Zelllinie FS VI eine mäßige bis hohe Zellzahl, während bei FS I nur eine geringe bis mäßige Zellzahl zu sehen war. Auch im Vorversuch fand sich bei dem PA-Transponder eine mäßige Zellzahl auf, aber eine hohe Dichte des Zellverbands um den Transponder. Außerdem wies die Transponderoberfläche viele Unebenheiten auf.

In anderen Studien erwies sich Parylene C in der Zellkultur als nicht toxisch (Webseite Nr. 13, Aufruf Jan/Feb 2006, s. Zitate „8.2. Webseiten“). Jedoch dokumentierten KAMMER et al. (2002), dass auf durch Trockenätzung hydrophiler gemachtem Parylene C die Haftungseigenschaften von Mäusefibroblasten (L929-Zellen) besser waren als bei unbehandeltem Parylene C. Unbehandeltes Parylene C wird hier als biokompatibles Material mit jedoch schlechter Obeflächenankopplung bezeichnet.

Diese Feststellung wäre eine mögliche Erklärung für das mäßige Ergebnis der In-vitro-Studie, ebenso wie die unregelmäßige Oberfläche der Transponder.

Insgesamt ist das Ergebnis für Parylene C in dieser Studie als günstig zu betrachten.

5.5.4 Titan

In der histologischen Analyse waren die einzige Auffälligkeiten die in einigen Fällen (4 von 10) vorkommenden schiefergrauen Partikel in der Kapsel, z.T. in Begleitung einer gering- bis mittelgradigen granulomatösen Fremdkörperreaktion. In zwei dieser Fälle war auch makroskopisch eine leichte Ablösung des Titans vom Bioglas des Transponders erkennbar, ferner schiefergraue Partikel im Gewebe nach Entnahme des Transponders.

Außerdem fand sich gelegentlich eine geringgradige gemischtzellige Entzündungsreaktion im perikapsulären Gewebe.

Ansonsten war die histologische Untersuchung unauffällig.

In anderen Untersuchungen von Gewebeproben von menschlichen Patienten mit Titanimplantaten wurden ebenfalls häufig eine makroskopische Metallose im periimplantären Gewebe und eine mikroskopische Phagozytose von Fremdpartikeln gefunden. Dieses Fremdmaterial erwies sich bei genauerer Analyse als Titan (LEITING et al., 2001). Daher handelt es sich auch in der hier vorgelegten Studie vermutlich um Titanpartikel.

POHLER (2000) stellt klar, dass die Abriebeigenschaften von Titan und seinen Legierungen nicht sehr gut sind. In diesem Review wird ebenfalls von Studien berichtet, bei denen Abriebpartikel im Gewebe um Titanimplantate gefunden wurden. Diese Ereignisse seien aber sehr selten, würden nur fokal gefunden und führten zu keiner Entzündungsantwort, heißt es. In einer anderen Studie, die die Gewebereaktion auf Titan im Vergleich mit anderen Materialien untersuchte, habe Titan immer die mildesten Gewebereaktionen gezeigt.

Die vorwiegend lymphohistiozytäre Zellinfiltration im perikapsulären Gewebe ist so geringgradig, dass ihre Bedeutung vernachlässigt werden kann.

In vitro zeigte sich insgesamt ein hohe bis sehr hohe Zellverbandsdichte um die Transponder bzw. war sie ebenso hoch wie in der Kontrolle. Das gilt für beide Transponder, die Ethylenoxid-sterilisierten und die autoklavierten. Bei der rasterelektronenmikroskopischen Betrachtung war insgesamt ebenfalls eine hohe Zellzahl in Form eines deutlichen Zellverbands auf den Transpondern zu finden; zwar war bei der Zelllinie FS I die Zellzahl auf

den autoklavierten geringer als auf dem Ethylenoxid-sterilisierten Transponder, aber im Vorversuch wurde auch auf den autoklavierten Titan-Transpondern eine hohe Zellzahl gefunden.

Das Ergebnis der In-vitro-Studie lässt den Schluss zu, dass Titan für Fibroblasten eine gute Adhäsions- und Wachstumsoberfläche bietet.

In anderen Studien bestätigt sich ebenfalls die gute Verträglichkeit von Titan in Zellkulturen (POHLER, 2000).

Insgesamt wird die Reaktion auf Titan in dieser Studie als eingeschätzt.

5.5.5 Aluminiumoxyd

Die Befunde der histologischen Untersuchung nach sieben Wochen lassen die Tendenz zu chronischen Entzündungsprozessen erkennen, bei denen die granulomatöse Komponente im Vordergrund steht. Gelegentlich (in 3 von 7 Präparaten) fand sich auch eine deutliche Ansammlung eosinophiler Granulozyten und/oder Lymphozyten. Außerdem war in einigen Präparaten (3 von 7) auch eine mittelgradige Infiltration mit Mastzellen zu sehen.

Die makroskopisch regelmäßig festgestellte Materialablösung im Zusammenhang mit den histologischen Befunden lässt auch hier den Schluss auf eine Fremdkörperreaktion zu.

Die häufige Beteiligung von eosinophilen Granulozyten und die mehr als geringgradige Beteiligung von Mastzellen in einigen Präparaten kann auf eine immunstimulierende Wirkung von Aluminiumoxyd hinweisen.

Ein geringgradiges Vorkommen von eosinophilen Granulozyten und Mastzellen in der gesunden Haut und Unterhaut von Mäusen ist zwar normal (GUDE et al., 1982; IWAMOTO et al., 1993; SUNDBERG, 2004), hier ist das Ausmaß jedoch höher.

Auch im In-vitro-Experiment hatte Aluminiumoxyd negative Effekte auf die Fibrosarkomzellen. Zum einen war die Zellrasendichte in der Umgebung der Transponder deutlich reduziert, und die Zellen zeigten morphologische Veränderungen in Form von Abrundung und fehlenden Zytoplasma-Ausläufern.

Zum anderen fand sich bei rasterelektronenmikroskopischer Betrachtung nur auf einem autoklavierten Transponder aus dem Vorversuch eine geringe Zellzahl an einer Stelle, ansonsten waren keine Zellen auf den Transpondern vorhanden.

Die Transponder wiesen nach der Bebrütung in der Zellkulturflasche ebenso wie in vivo eine Materialablösung auf. Diese Ergebnisse gelten für die Ethylenoxid-sterilisierten Transponder und die autoklavierten Transponder gleichermaßen.

Die erzielten Ergebnisse stehen im Widerspruch zu bisherigen Erfahrungen mit Aluminiumoxyd als Implantatmaterial. Es gilt zum einen als Prototyp einer bioinerten Keramik und wird regelmäßig z.B. als Hüftgelenkersatz verwendet (CHRISTEL, 1992; HANNOUCHE et al., 2005; NEUMANN et al., 2004). Es gilt als sehr gut biokompatibel (ANNEROTH et al., 1990). Bei einer Materialablösung durch mechanischen Abrieb wären die Partikel in der HE-Färbung sichtbar (CHRISTEL, 1992; HARMS und MÄUSLE, 1979). Eine chemische Oberflächenkorrosion scheidet eigentlich aus, da Aluminiumoxyd als sehr korrosionsbeständig gilt (HANNOUCHE et al., 2005) und durch seine höchste Oxidationsstufe als chemisch inert betrachtet werden kann (CHRISTEL, 1992).

HANNOUCHE et al. (2005) sagen, selbst wenn es zu Materialabrieb kommt, so werden diese Partikel sehr gut toleriert, sowohl in vivo als auch in vitro; Aluminiumoxyd-Partikel sind fast bioinert. In vivo werden sie zwar von Makrophagen phagozytiert, zu einer Fremdkörperreaktion scheint es aber nur bei hochgradigem Abrieb zu kommen. CHRISTEL (1992) hingegen führt einige Studien an, in denen histiozytäre Fremdkörper-Granulome auf Aluminiumoxyd-Partikel gefunden wurden; diese Reaktionen waren allerdings gering. Es handelte sich immer um Gewebeproben von Hüftgelenksprothesen beim Menschen.

Das Material ist hydrophil (CHRISTEL, 1992; HANNOUCHE et al., 2005) und gilt als untoxisches Referenzmaterial bei In-vitro-Zytotoxizitätsuntersuchungen (NEUMANN et al., 2004); auch CHRISTEL (1992) führt Beispiele an, in denen gezeigt wurde, dass Aluminiumoxyd in vitro für Fibroblasten untoxisch ist bzw. Zellen eine gute Adhäsionsfläche bietet.

Es fehlt also auch die Erklärung für die schlechten Ergebnisse in vitro.

Leider kann hier keine befriedigende Erklärung gefunden werden, weder für die Materialablösung noch für die starken Reaktionen auf dieses Material.

Es ist höchstens vorstellbar, dass es durch Hydrolyse zur Bildung von Aluminiumhydroxyd kommt, welches dann leichter von der Transponderoberfläche abgelöst werden könnte (BEYER, 2006); diese Partikel müssten so klein gewesen sein, dass sie in der HE-Färbung nicht zu sehen waren. Dagegen spricht aber, dass die Beschichtung mit Aluminiumoxyd sehr dünn war (ca. 200 nm), wodurch die Verbindung zum darunter liegenden Bioglas sehr stark

war (BEYER, 2006) Außerdem wurde bereits erwähnt, dass Aluminiumoxyd durch seine höchste Oxidationsstufe als chemisch inert zu sehen ist.

Selbst wenn sich tatsächlich Partikel gelöst haben, muss es weiteren Untersuchungen überlassen bleiben zu klären, weshalb die Reaktion auf das Material so stark war.

Zusammenfassend ist also zu sagen, dass Aluminiumoxyd als Beschichtungsmaterial in dieser Studie eine ungünstige Reaktion bewirkte, wofür eine plausible Erklärung aber derzeit fehlt.

5.5.6 Vergleichende Betrachtung der Ergebnisse

Die Auswertung dieser Studie erfolgte unter der Prämisse, dass eine hohe Zellverbandsdichte bzw. eine hohe Zellzahl in vitro auf und um die Transponder sowie eine möglichst geringe Entzündungsreaktion im Gewebe für die Ortstabilität der Transponder günstig ist.

Insgesamt haben Parylene C und Titan in dieser Studie die günstigsten Ergebnisse erzielt.

Dabei muss berücksichtigt werden, dass in vitro Titan ein weitaus besseres Resultat als Parylene C zeigte. In vivo hingegen sorgten die seltene Materialablösung und die geringgradige Fremdkörperreaktion auf die Titanpartikel für eine leichte Beeinträchtigung des ansonsten guten histologischen Ergebnisses. Zwar fanden sich in der histologischen Untersuchung auch bei Parylene C Fremdkörperpartikel mit einer gelegentlichen Fremdkörperreaktion um die Transponder, diese Reaktionen fielen aber geringer aus als es bei Titan der Fall war.

Am schlechtesten schnitten Aluminiumoxyd und Bioglas ab, die in beiden Versuchsteilen ungünstige Reaktionen hervorriefen.

Bei Bioglas kann dieser Befund mit hoher Wahrscheinlichkeit mit der vaselineartigen Masse auf den Transpondern und den Kanülen des Injektionssystems begründet werden.

Hingegen fehlt für Aluminiumoxyd eine plausible Erklärung.

Keine eindeutige Bewertung ergibt sich für Polypropylen - es nimmt im Vergleich mit den anderen Materialien eine Zwischenstellung ein. Festzustellen bleibt, dass zwar die Reaktionen auf Polypropylen zum Teil günstig oder zumindest nicht schlecht waren; dennoch ist das Auftreten der Granulationsgewebsbildung in dieser Studie kein Einzelfall. Bei Polypropylen muss auch die besondere Struktur der Kappe als möglicher Einflussfaktor auf die In-vivo-Reaktion berücksichtigt werden.

Den Ergebnissen dieser Studie zufolge kann durch die Wahl des Transponder-Oberflächenmaterials der Kapselaufbau und die sonstige Entzündungsreaktion im umgebenden Gewebe beeinflusst werden. Das gleiche gilt für das Zellwachstum in Gegenwart der Transponder. Dadurch wird mit großer Wahrscheinlichkeit auch die Ortstabilität des Transponders beeinflusst.

Somit scheinen Titan und Parylene C geeignete Materialien zur Beschichtung von Transpondern zu sein.

Schließlich bleibt zu erwähnen, dass in der In-vitro-Studie insgesamt keine Unterschiede zwischen den Reaktionen auf autoklavierte und Ethylenoxid-sterilisierte Transponder festzustellen waren.

5.6 Biokompatibilität von Transpondern

Eingangs wurde der Begriff der Biokompatibilität näher erläutert. Der Definition nach hängt die Biokompatibilität eines Implantats auch davon ab, ob es seinen Zweck im Körper erfüllt (siehe Literaturübersicht „2.5.6.1 Begriff der Biokompatibilität“).

Ein Transponder kann dann als biokompatibel angesehen werden, wenn er eine gute Gewebeverträglichkeit zeigt und ortstabil bleibt.

5.7 Die Bedeutung des Oberflächenmaterials von Transpondern gegenüber anderen ursächlichen Faktoren der Migration

JANSEN et al. (1999) untersuchten in ihrer Studie mögliche Zusammenhänge zwischen Transponder-Oberflächenmaterial und -Oberflächenbeschaffenheit, der Implantationsstelle und der Wanderung der Transponder. Die Hunde, denen die Transponder implantiert wurden, wurden in Kurznarkose gelegt, die Haut über der Implantationsstelle wurde rasiert und desinfiziert. Die Person, welche die Injektion der Transponder vornahm, galt als sehr erfahren.

Es stellte sich heraus, dass alle Transponder eine gewisse Distanz gewandert waren, am stärksten diejenigen, die kaudal des Schulterblattes implantiert worden waren.

Es wurde u.a. auch eine histopathologische Untersuchung des Gewebes um die Transponder durchgeführt; diese ergab eine starke Ansammlung von Entzündungszellen um drei der insgesamt 75 Transponder. Die Autoren fanden keinen offensichtlichen Zusammenhang zwischen der Entzündung und der Wanderung der Transponder. In dieser Studie schien eher die Implantationsstelle anstatt Eigenschaften des Transponders für die Wanderung verantwortlich zu sein.

Durch die Ergebnisse der Studie von JANSEN et al. (1999) wird noch einmal deutlich, dass die Migration von Transpondern ein multifaktorielles Geschehen zu sein scheint; selbst nachdem zwei wichtige Faktoren der Migration ausgeschlossen worden waren, nämlich die Unerfahrenheit der implantierenden Person und die Bewegung des Tieres beim Implantationsvorgang, wurde eine Wanderung der Transponder beobachtet.

Die vorliegende Studie konzentrierte sich auf die Oberflächenmaterialien von Transpondern als Einflussfaktor auf die Reaktionen in vivo und in vitro. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine hohe Zellverbandsdichte bzw. eine hohe Zellzahl in vitro auf und um die Transponder sowie eine möglichst geringe Entzündungsreaktion im Gewebe der Migration von Transpondern entgegenwirkt. Die Hypothese, dass die Migration ein multifaktorielles Geschehen ist, bleibt davon unangetastet.

Zusätzlich gibt es weitere Gründe für eine gute Gewebeverträglichkeit des Implantats:

1. Das Risiko der Tumorentstehung an der Implantationsstelle als mögliche Folge einer langanhaltenden Zell-Proliferation im Rahmen einer chronischen Entzündung (siehe „5.2 Einfluss der In-vivo- und In-vitro-Reaktionen auf die Ortstabilität der Transponder“).
2. Die Akzeptanz des Tierbesitzers bezüglich des Transponders als Langzeitimplantat im eigenen Tier

5.7.1 Neue Einteilung der Migrationsfaktoren

Während in der Literaturübersicht die Einteilung der ursächlichen Faktoren nach Art der Verursachung erfolgte (siehe Literaturübersicht „2.5.3 Hypothesen zur Ursache der Migration“), richtet sich folgende Einteilung nach ihrem zeitlichen Auftreten:

1. Einmalige Faktoren

Injektionstechnik und -erfahrung, Alter des Tieres, Unruhe des Tieres bei Implantation

2. Kontinuierliche Faktoren

Anatomie, Transpondergröße und -form, Oberflächenmaterial und -beschaffenheit des Transponders, Implantationsstelle

3. Unregelmäßig wiederkehrende Faktoren

Palpation des Transponders nach Implantation, andere äußere Krafteinwirkungen auf den Transponder

(zur näheren Erläuterung siehe Literaturübersicht „2.5.5 Die von Mensch und Tier ausgehenden Migrations-Faktoren im Einzelnen“ und „2.5.6 Der Einfluss des Transponders auf die Vorgänge im Gewebe“)

Diese Einteilung macht deutlich, welche Faktoren vermutlich den stärksten Einfluss auf die Migration haben, nämlich diejenigen, die kontinuierlich sind. Hierzu zählen neben Anatomie des Tieres und Wahl der Implantationsstelle auch die Eigenschaften des Transponders selbst. Von diesen Faktoren sind die Transponder-Eigenschaften und hier vor allem das Oberflächenmaterial am ehesten variabel und zu beeinflussen.

Darin liegt nach eigener Einschätzung die Bedeutung des Oberflächenmaterials von Transpondern gegenüber anderen Migrationsfaktoren.

Folgende Übersicht soll den Zusammenhang zwischen den einzelnen, in der Literatur genannten Faktoren und den Vorgängen im Gewebe besser veranschaulichen (Abb. 102).

Es wird deutlich, dass die meisten Faktoren zwei hauptsächliche Schritte in der Pathogenese der Migration zur Folge haben, nämlich die Bewegung des Transponders am Implantationsort oder ein direktes Trauma im Gewebe. Ein dritter ursächlicher Einstiegspunkt für die Migration ist die Entzündungsreaktion im Gewebe.

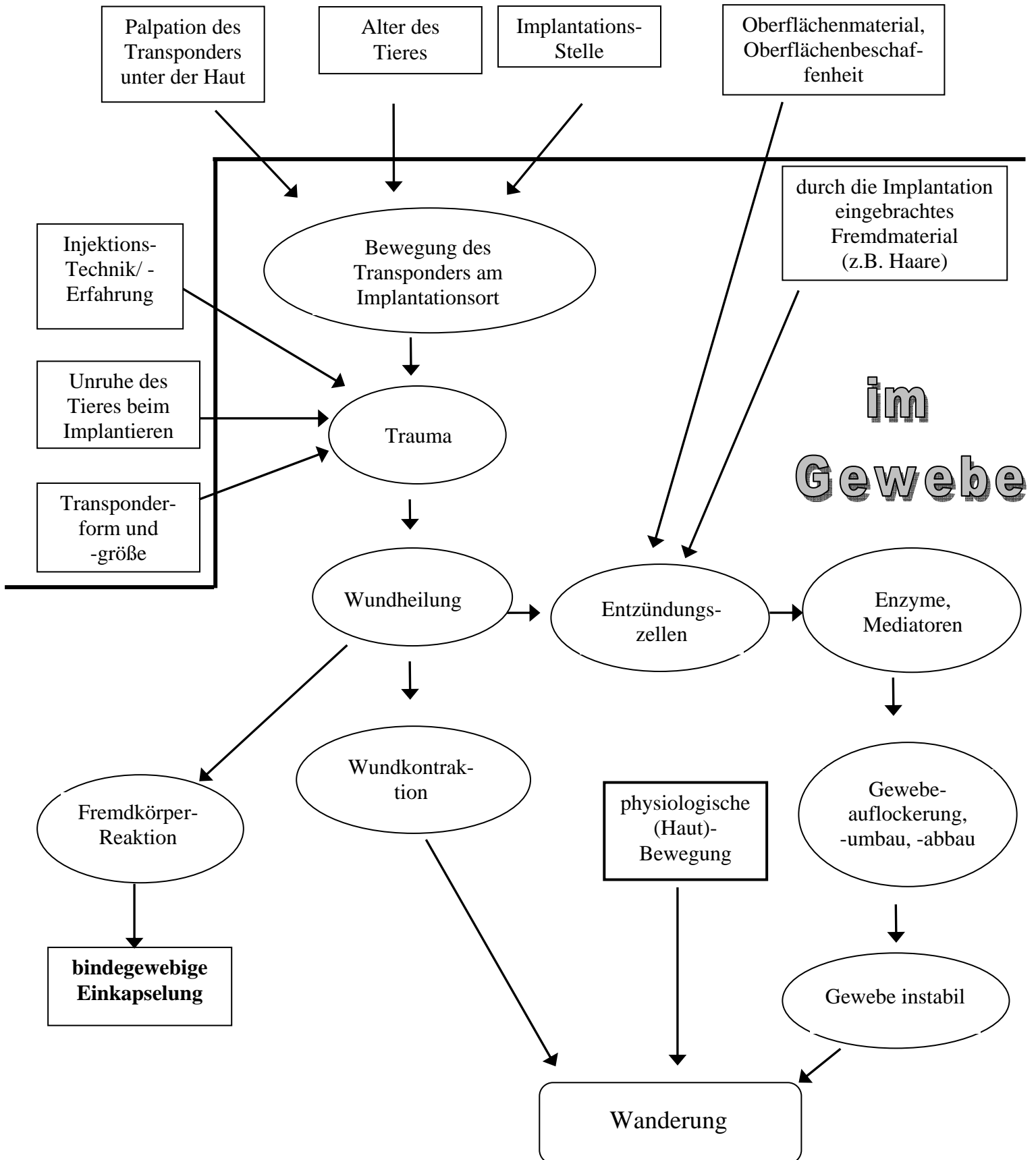


Abb. 102: Übersicht zur Pathogenese der Migration/Wanderung

6 Zusammenfassung

Die häufigste unerwünschte Reaktion im Zusammenhang mit implantierbaren Transpondern zur Identifikation von Tieren ist die Wanderung der Implantate im Tierkörper. Sie lässt sich vermutlich auf mehrere Ursachen zurückführen, u.a. auf das Oberflächenmaterial des Transponders.

Ziel dieser Studie war es, die Reaktionen auf Transponder mit fünf verschiedenen Oberflächenmaterialien zu untersuchen und zu vergleichen.

Im Rahmen einer pathologisch-morphologischen Bestandsuntersuchung von Mäusen wurde auch das Gewebe um die implantierten Transponder histopathologisch untersucht. 43 Mäuse waren mit fünf verschiedenen Transpondertypen markiert worden. Bei den Materialien handelte es sich um Bioglas, Bioglas mit einer Polypropylenkappe, Parylene C, Titan und Aluminiumoxyd. Vom Zeitpunkt der Implantation bis zur Euthanasie der Tiere waren sieben Wochen vergangen.

Das Gewebe um die Transponder wurde vor allem hinsichtlich der Entzündungsreaktionen untersucht und ausgewertet.

Im sich anschließenden In-vitro-Teil der Studie wurden Transponder mit den fünf verschiedenen Oberflächenmaterialien in Zellkulturflaschen platziert und mit zwei verschiedenen feline Fibrosarkomzelllinien beschickt; nach einer Bebrütungszeit von drei bzw. vier Tagen wurden die Anzahl und die Morphologie der Zellen um und auf den Transpondern beurteilt, zum einen im Gewebekulturmikroskop, zum anderen im Rasterelektronenmikroskop.

Auf den Bioglas-Transpondern fiel bei der Ablage in die Zellkulturflaschen makroskopisch eine zähe, wachsartige Masse auf, die auch an den Kanülen des Injektionssystems vorhanden war.

Bei den Aluminiumoxyd-Transpondern wurde in beiden Versuchsteile makroskopisch häufig festgestellt, dass sich das oberflächliche Material teilweise von der Transponderoberfläche abgelöst hatte, also sowohl bei der Entnahme der Transponder aus dem Gewebe als auch aus den Zellkulturflaschen. Einen ähnlichen Befund gab es in seltenen Fällen bei Entnahme der Titan-Transponder aus dem Gewebe. In diesen Fällen waren zudem makroskopische Graufärbungen im Gewebe um die Transponder zu sehen.

Bei der histopathologischen Untersuchung war der Transponder in allen Präparaten von einer dünnen Bindegewebskapsel umgeben.

Es ergab sich sowohl für Bioglas als auch für Aluminiumoxyd eine deutliche Tendenz zur granulomatösen Entzündung. Bei Bioglas waren die Granulome mit optisch leeren Hohlräumen assoziiert, die an Fettvakuolen erinnerten. Allerdings fand sich diese Reaktion nicht um den Bioglasteil der Polypropylen-Transponder.

Sowohl bei Bioglas als auch bei Aluminiumoxyd gab es auch eine z.T. mittelgradige Beteiligung von eosinophilen Granulozyten und Mastzellen, sowie geringgradig von neutrophilen Granulozyten und bei Bioglas auch Lymphozyten.

Auf die Transponder mit den Polypropylenkappen reagierten mehrere Mäuse mit einer gering- bis mittelgradigen chronischen Granulationsgewebsbildung. Außerdem waren die Haargranulome bei Polypropylen stärker ausgeprägt als bei den anderen Materialien.

Parylene C und Titan zeigten die wenigsten Gewebereaktionen. Bei Titan wurde in seltenen Fällen mikroskopisch eine gering- bis mittelgradige Fremdkörperreaktion um Titanpartikel beobachtet, während bei Parylene C gelegentlich doppelbrechende Materialeinschlüsse mit einer begleitenden minimalen bis geringgradigen Fremdkörperreaktion erkennbar waren.

Die Beurteilung der Dichte des Zellverbandes und Anzahl von feline Fibrosarkomzellen in vitro in der Umgebung von und auf den Transpondern ergab für Bioglas und Aluminiumoxyd eine minimale bis geringe Dichte in der Umgebung von und so gut wie keine Zellen auf den Transpondern. Bei Polypropylen und Parylene C war die Dichte des Zellrasens um die Transponder hoch, auf ihnen war aber nur eine mäßige Zellzahl vorhanden. Bei Titan zeigte sich eine hohe Dichte um die Transponder, außerdem war auf den Transpondern eine hohe Zellzahl mit einer deutlichen Verbandsbildung zu sehen.

Es wird diskutiert, dass sich eine mit wenigen Entzündungszeichen im Gewebe einhergehende Reaktion sowie ein gutes Zellwachstum in Gegenwart des Transponders in der Zellkultur vermutlich günstig auf die Ortstabilität des Transponders auswirken.

Titan und Parylene C erzielten in dieser Studie die besten Ergebnisse, wobei Titan in der In-vitro-Studie ein deutlich besseres Ergebnis als Parylene C zeigte, das durch die in seltenen Fällen abgelösten Metallpartikel und die daraus resultierende geringgradige Fremdkörperreaktion im In-vivo-Teil aber wieder etwas relativiert wurde.

Vor diesem Hintergrund und den Ergebnissen dieser Studie scheinen Parylene C und Titan die am besten geeigneten Materialien zur Beschichtung von Transpondern zu sein.

7 Summary

The most common adverse reaction to transponders for animal identification is migration of the device in the animal's body. Migration is supposed to depend on several factors, e.g., the surface material of the transponder.

The aim of this study was to analyse and compare the reactions to transponders with five different surface materials.

Within a pathological-morphologic stock surveillance of mice the tissue around the transponders was histopathologically examined, too. 43 mice had been chipped with transponders of five different surface materials. The materials were bioglass, bioglass with a polypropylene cap, parylene C, aluminium oxide, and titanium. From the implantation to the euthanasia a period of seven weeks had passed.

The specimens were evaluated histopathologically mainly with respect to the inflammation reactions in the tissue.

In the in vitro part of the study transponders of each surface-material were placed in cell culture flasks in addition to two different feline fibrosarcoma cell lines. After an incubation period of three respectively four days number and morphology of the cells were evaluated on and around the transponders by using a tissue culture microscope and scanning electron microscopy.

A petrolatum-like mass was macroscopically detected on the bioglass transponders while placing them into the cell culture flasks. The same substance was also seen on the canulae of the injection device.

In both parts of this study it was macroscopically obvious that numerous aluminium oxide transponders had lost chips of their surface material, when removing them from the tissue or from the cell culture flasks. A similar observation was made for few titanium transponders when removing them from the tissue. In these cases a greyish discolouration could be detected macroscopically in the tissue around the transponders.

The histopathological examination revealed in every case a thin fibrous capsule surrounding the transponders.

Transponders coated by bioglass and aluminium oxide, often induced a granulomatous inflammation. The granulomas in the tissue surrounding the bioglass transponders were often associated with optical empty spaces resembling lipid vacuoles. However, this reaction could not be found around the bioglass part of the polypropylene transponders. In both materials (aluminium oxide and bioglass) several specimens showed an infiltration of eosinophils and mast cells in a medium degree as well as a mild infiltration of neutrophilic granulocytes and – for bioglass – lymphocytes, too.

The reaction to the transponders with a polypropylene cap was in some cases a mild to moderate chronic proliferation of granulation tissue. Besides, around polypropylene transponders, there occurred larger hair-granulomas than around the other transponders.

Parylene C and titanium induced the least tissue reactions; around some titanium transponders a microscopically visible deposit of titanium particles accompanied by a mild foreign body reaction occurred, while in a few parylene C specimens inclusions of a birefringent foreign material with a mild foreign body reaction were detected.

Estimation of the density of the cell structure and the number of feline fibrosarcoma cells on and around the transponders revealed for aluminium oxide and bioglass a low density around the transponders and almost no cells on them.

The density of the cell structure around the polypropylene and parylene C transponders was high, but on the material the number of cells was only intermediate.

There was a dense, confluent cell layer seen around and on the titanium transponders.

It is discussed that a tissue reaction with only little signs of inflammation and an unimpaired cell growth in culture may be favourable for the local stability of the transponder at its implantation site.

Titanium and parylene C got the best results in this study.

Titanium showed a clearly better result in the in vitro part than parylene C. In the histopathological evaluation, the good result was partially reduced by the occasional foreign body reaction around titanium particles.

Among the examined surface materials parylene C and titanium therefore seem to be the best suitable coating materials for implantable transponders.

8 Zitate

8.1 Literaturverzeichnis

Anneroth, G., A. R. Ericsson, L. Zetterqvist (1990)

Tissue integration of Al₂O₃-ceramic dental implants (Frialit) - a case report
Swed. Dent. J. 14, 63-70

Anonymus (1990)

Glass 8625 (Bioglass)
Certificate of AECO of 1990/09/04 about the suitability of 8625 for the encapsulation
of animal identification systems
Firma Schott AG

Anonymus (1998)

Microchips: an overview
Aust. Vet. J. 76, 520

Arndt J., C. Wiedemann (1991)

Zusammenfassung von Verträglichkeitsprüfungen mit Transpondern des
elektronischen Markierungssystems INDEXEL[®]
Kleintierpraxis 36, 381-389

Artmann, R. (1994)

Technischer Stand und Entwicklungsmöglichkeiten des standardisierten Transponders
In: Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. (KTBL),
Darmstadt (Hrsg.) Injektate zur elektronischen Tieridentifizierung
Landwirtschaftsverlag GmbH, Münster-Hiltrup, Arbeitspapier 205, 17-35

Bacher, M. (2005)

Schriftliche Mitteilung
Plasma Parylene Coating Service, Rosenheim-Pang

Ball, D. J., G. Argentieri, R. Krause, M. Lipinski, R. L. Robison, R. E. Stoff, G. E. Visscher (1991)

Evaluation of a microchip implant system used for animal identification in rats
Lab. Anim. Sci. 41, 185-186

Behlert O., N. Willms (1992)

Gewebsreaktionen auf implantierte Transponder eines elektronischen
Markierungssystems
Kleintierpraxis 37, 51-54

Beyer, Norbert

Schriftliche Mitteilung
AlCove Surfaces GmbH, Gladbeck

**Blanchard, K.T., C. Barthel, J. E. French, H. E. Holden, R. Moretz,
F. D. Pack, R. W. Tennant, R. E. Stoll (1999)**

Transponder-induced sarcoma in the heterozygous p53^{+/-} mouse
Toxicol. Pathol. 27, 519–527

Burk, R. L., D. W. Eich (1995)

Migrating microchip
J. Am. Vet. Med. Assoc. 206, 1838

Butcher, R. (1998)

Migration of microchips in dogs and cats
Vet. Rec. 143, 87

Christel, P. S. (1992)

Biocompatibility of surgical-grade dense polycrystalline alumina
Clin. Orthop. Relat. Res. 282, 10-18

Elcock, L.E., B.P. Stuart, B.S. Wahle, H.E. Hoss, K. Crabb, D.M. Millard, R.E. Mueller, T.F. Hasting, S.G. Lake (2001)

Tumors in long-term rat studies associated with microchip animal identification devices

Experimental Toxicological Pathology 52, 483-491

Evans, R., R. Holman, E. Lindsay (2005)

Migration of implanon: two case reports

J. Fam. Plann. Reprod. Health Care 31, 71-72.

Ferencz, T. (2005)

Fragen zur Transponderkennzeichnung beim Pferd

Prakt. Tierarzt 86, 36-40

Fry, R., R. Green (1999)

Biological and migrational characteristics of microchips

Vet. Rec. 145, 564

Gabel, A. A., R. C. Knowles, S. E. Weisbrode (1988)

Horse identification: A field trial using an electronic identification system

J. Equ. Vet. Sci. 8, 172-176

Geisel, O., M. Klindtworth, G. Wendl, H. Schön, W. Hermanns (1998)

Transponder bei Rindern: Histologische Befunde zehn und zwölf Monate nach subkutaner Implantation

Tierärztl. Umschau 53, 192-200

Gruys, E., J. M. Schakenraad, L. K. Kruit, J. M. Bolscher (1993)

Biocompatibility of glass-encapsulated electronic chips (transponders) used for the identification of pigs

Vet. Rec. 133, 385-388

Gude, W. D., G. E. Cosgrove, G. P. Hirsch (1982)

Histological atlas of the laboratory mouse
Plenum Press, New York and London, 98-99

Hannouche, D., M. Hamadouche, R. Nizard, P. Bizot, A. Meunier, L. Sedel (2005)

Ceramics in total hip replacement
Clin. Orthop. Relat. Res. 430, 62-71

Harms, J., E. Mäusle (1979)

Tissue reaction to ceramic implant material
J. Biomed. Mater. Res. 13, 67-87

Hüther, S. (2005):

Mündliche Mitteilung
Geschäftsführer Fa. Planet ID GmbH, Essen

Hüther, S. (2006):

Mündliche Mitteilung
Geschäftsführer Fa. Planet ID GmbH, Essen

ISO 10993-5: 1999: Biological evaluation of medical devices -- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity

ISO 10993-12: 2002: Biological evaluation of medical devices -- Part 12: Sample preparation and reference materials

ISO 11784: 1996: Radio frequency identification of animals -- Code structure

ISO 11785: 1996: Radio frequency identification of animals -- Technical concept

ISO 6474: 1994: Implants for surgery -- Ceramic materials based on high purity alumina

Iwamoto, I., S. Tomoe, H. Tomioka, S. Yoshida (1993)

Leukotriene B₄ mediates Substance P-induced granulocyte infiltration into Mouse Skin
J. Immunol. 151, 2116-2123

Jansen, J. A., J. P. C. M. van der Waerden, R. H. Gwalter, S. A. B. von Rooy (1999)

Biological and migrational characteristics of transponders implanted into beagle dogs
Vet. Rec. 145, 329-333

Kammer, S., S. Wien, K. P. Koch, A. Robitzki, T. Stieglitz (2002)

Untersuchungen zur Abscheidung von Parylen C als Kapselungsmaterial für
biomedizinische Mikroimplantate
Biomed. Tech. (Berl.) 47 Suppl. 1 Pt . 2, 823-826

Klinge, U., B. Klosterhalfen, M. Müller, V. Schumpelick (1999)

Foreign body reaction to meshes used for the repair of abdominal wall hernias
Eur. J. Surg. 165, 665-673

Konermann, H. (1994)

Einsatzverfahren mit injizierbaren Transpondern in der Pferdehaltung
In: Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. (KTBL),
Darmstadt (Hrsg.) Injektate zur elektronischen Tieridentifizierung
Landwirtschaftsverlag GmbH, Münster-Hiltrup, Arbeitspapier 205, 55-67

Kumar, V., A. K. Abbas, N. Fausto (2005)

Tissue renewal and repair: regeneration, healing, and fibrosis
Acute and chronic inflammation
In: Robbins, S.L., R.S. Cotran (eds.) Pathologic Basis of Disease (7th edition)
Elsevier Saunders, Philadelphia, 47-86; 87-118

Kummerfeld, N., W. Meyer, R. Herrmann (2002)

Praxisnahe Hilfen zur Identifizierung von Vögeln und Reptilien: der „Fingerabdruck“
als Verbindung moderner Kriminalistik mit Tier- und Artenschutz
Voliere 25, 289-320

Lammers, G. H., N. G. Langeveld, E. Lambooij, E. Gruys (1995)

Effects of injecting electronic transponders into the auricle of pigs
Vet. Rec. 136, 606-609

Leiting, S., S. Assenmacher, H. Brauer, U. Obertacke, G. Voggenreiter (2001)

Gewebereaktion auf Titanpartikel – Histologische Untersuchungen an
Plattenbettgewebe (LC-DCP)
Materwiss. Werkstofftech. 32, 172-177

Lindl, T. (2000)

Zell- und Gewebekultur (4. Auflage)
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin, 22

Löhberg-Grüne, C., U. Hetzel, H. Werner, M. Reinacher (2004)

Morphological and phenotypical features of feline vaccination site-associated
fibrosarcoma cell lines
In: Babińska, I., J. Szarek, J. Lipińska (ed.) Pathology in nowadays
Abstracts from 22nd meeting of the European Society of Veterinary Pathology,
Olsztyn-Poland 15. – 18. September 2004
University of Warmia and Mazury in Olsztyn, 130

Mader, C., O. Geisel, H. Gerhards, W. Hermanns (2002)

Implantation von Transpondern am Ohrgrund bei Equiden
Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 115, 161-166

Muller, G. H., R. W. Kirk, D. W. Scott, W. H. Miller, C. E. Griffin (2001)

Muller & Kirk's Small Animal Dermatology (6th edition)
W.B. Saunders Company, Philadelphia London New York St. Louis Sydney Toronto,
1091-1096

Murasugi, E., H. Koie, M. Okano, T. Watanabe, R. Asano (2003)

Histological reactions to microchip implants in dogs

Vet. Rec. 153, 328-330

Neumann, A., T. Reske, M. Held, K. Jahnke, C. Ragoß, H.R. Maier (2004)

Comparative investigation of the biocompatibility of various silicon nitride ceramic qualities in vitro

J. Mater. Sci. Mater. Med. 15, 1135-1140

Niggemeyer, H. (1994)

Einsatzerfahrungen mit injizierten Transpondern in der Schweinehaltung

In: Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. (KTBL),

Darmstadt (Hrsg.) Injektate zur elektronischen Tieridentifizierung

Landwirtschaftsverlag GmbH, Münster-Hiltrup, Arbeitspapier 205, 50-54

Nind, F. (1999)

Microchip identification

Vet. Rec. 145, 532

Ober, K. (1998)

Zum Einsatz injizierbarer Infodex[®]-Transponder zur Kennzeichnung von Mastschweinen unter besonderer Berücksichtigung von Desinfektions- und Sterilisationsmaßnahmen an Transponder und Implantationskanüle

Vet. Med. Diss., Gießen

Pirkelmann, H., C. Kern (1994)

Einsatzerfahrung mit injizierten Transpondern in der Rinderhaltung

In: Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. (KTBL),

Darmstadt (Hrsg.) Injektate zur elektronischen Tieridentifizierung

Landwirtschaftsverlag GmbH, Münster-Hiltrup, Arbeitspapier 205, 36-49

Pirkelmann, H., G. Wendl, C. Kern (1992)

Elektronische Tieridentifizierung als Voraussetzung für den Einsatz rechnergestützter Verfahren in der Tierhaltung

In: Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. (KTBL), Darmstadt (Hrsg.) Landwirtschaft und Elektrizität – Artgerechte Haltungssysteme durch den Einsatz von Elektronik

Landwirtschaftsverlag GmbH, Münster-Hiltrup, Arbeitspapier 170, 9-19

Pohler, O. E. M. (2000)

Unalloyed titanium for implants in bone surgery

Injury 31 Suppl. 4, 7-13

Rao, G. N., J. Edmondson (1990)

Tissue reaction to an implantable identification device in mice

Toxicol. Pathol. 18, 412-416

Ratner, B. D. (2002)

Reducing capsular thickness and enhancing angiogenesis around implant drug release systems

J. Control. Release 78, 211-218

Reisch, E. (1992)

Einführung

In: Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. (KTBL), Darmstadt (Hrsg.) Landwirtschaft und Elektrizität – Artgerechte Haltungssysteme durch den Einsatz von Elektronik

Landwirtschaftsverlag GmbH, Münster-Hiltrup, Arbeitspapier 170, 7-8

Reuling, N., M. Keil, B. Pohl-Reuling (1991)

Histokompatibilität von Implantatwerkstoffen

Dtsch. Zahnärztl. Z. 46, 694-698

Ribó, O., C. Korn, O. Meloni, M. Cropper, P. De Winne, M. Cuypers (2001)

IDEA: a large-scale project on electronic identification of livestock.

Rev. Sci. Tech. 20, 426-36

Römpf, H. (1995)

Aluminumoxide

Polypropylene

Titan

In: Falbe, J., M. Regitz (Hrsg.) Römpf Chemie Lexikon (9. Auflage)

Bd. 1, Bd. 5, Bd. 6

Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York

Stein, F. J., S. C. Geller, J. C. Carter (2003)

Evaluation of microchip migration in horses, donkeys, and mules

J. Am. Vet. Med. Assoc. 223, 1316-1319

Sundberg, J. P. (2004)

Skin and Adnexa of the Laboratory Mouse

In: Hedrich, H. J., G. Bullock (eds.) The Laboratory Mouse

Elsevier Academic Press, Amsterdam Boston Heidelberg London New York Oxford

Paris San Diego San Francisco Singapore Sydney Tokio, 195-204

Swift, S. (2000)

Microchip adverse reactions

J. Small. Anim. Pract. 41, 232

Swift, S. (2002)

Keeping track of microchip adverse reactions

J. Small. Anim. Pract. 43, 570

Swift, S. (2004)

Adverse reactions to microchips

J. Small. Anim. Pract. 45, 47

**Tillmann, T., K. Kamino, C. Dasenbrock, H. Ernst, M. Kohler, G. Morawietz,
E. Campo, A. Cardesa, L. Tomatis, U. Mohr (1997)**

Subcutaneous soft tissue tumours at the site of implanted microchips in mice

Exp. Toxicol. Pathol. 49, 197-200

Vascellari, M., F. Mutinelli, R. Cossettini, E. Altinier (2004)

Liposarcoma at the site of an implanted microchip in a dog

Vet. J. 168, 188-190

Verordnung (EG) Nr. 998/2003 über die Veterinärbedingungen für die Verbringung von
Heimtieren zu anderen als Handelszwecken und zur Änderung der Richtlinie
92/65/EWG**Voss, D. (2005)**

Schriftliche Mitteilung

Geschäftsführer Fa. Plasma Parylene Coating Service, Rosenheim-Pang

Vrouwenvelder, W. C. A., C. G. Groot, K. de Groot (1992)

Behaviour of fetal rat osteoblasts cultured in vitro on bioactive glass and
nonreactive glasses

Biomaterials 13, 382-392

Williams, D. F. (1999)

Biocompatibility

Bioglass

In: The Williams dictionary of biomaterials

Liverpool University Press, Liverpool

Zhong, J. P., D. C. Greenspan, J. W. Feng (2002)

A microstructural examination of apatite induced by Bioglass® in vitro

J. Mater. Sci. Mater. Med. 13, 321-326

8.2 Webseiten

Datum der Auffindung: Januar/ Februar 2006

Webseite Nr. 1 <http://de.wikipedia.org/wiki/Aluminiumoxid>

Webseite Nr. 2 <http://de.wikipedia.org/wiki/Polypropylen>

Webseite Nr. 3 http://de.wikipedia.org/wiki/Titan_%28Element%29

Webseite Nr. 4 <http://idea.jrc.it/pdf%20report/6%20recommendations.pdf>

Webseite Nr. 5 http://sylvester.bth.rwth-aachen.de/dissertationen/2004/161/04_161.pdf

Webseite Nr. 6 <http://www.avma.org/onlnews/javma/jul04/040701a.asp>

Webseite Nr. 7 <http://www.bsava.com/resources/microchipadvice/adversereactionform/>

Webseite Nr. 8 <http://www.bsava.com/resources/microchipadvice/implantationsites/>

Webseite Nr. 9 <http://www.bsava.com/resources/microchipadvice/latestreport/>

Webseite Nr. 10 <http://www.destronfearing.com/safetyrfid.htm>

- Webseite Nr. 11 <http://www.devicelink.com/mpb/archive/96/03/004.html>
- Webseite Nr. 12 http://www.ibmt.fraunhofer.de/projects/deutschalt/index_parylene_de.html
- Webseite Nr. 13 <http://www.itemp.rwth-aachen.de/retina/retina06.html>
- Webseite Nr. 14 <http://www.pat.rwth-aachen.de/retina/bio.html>
- Webseite Nr. 15 <http://www.pet-id.net/whatispetid.htm>
- Webseite Nr. 16 http://www.virbac.de/tierhalter/tier_identifikation/kennzeichnung.asp
- Webseite Nr. 17 <http://www.wsava.org/Icar399.htm>

9 Anhang

9.1 Tabellen zur histopathologischen Untersuchung

Legende

Abkürzungen

BGW = Bindegewebe
 EGR = eosinophile Granulozyten
 EZ = Entzündung
 FB = Fibroblasten
 FG = Fettgewebe
 FK = Fremdkörper
 ggr. = geringgradig
 hgr. = hochgradig
 LZ = Lymphozyten
 MØ = Makrophage(n)
 mgr. = mittelgradig
 min. = minimal
 MZ = Mastzellen
 NGR = neutrophile Granulozyten
 PZ = Plasmazellen
 QM = quergestreifte Muskulatur
 RZ = Riesenzelle(n)

Winkelbereich = lockeres
 Bindegewebe im Winkel zwischen
 Hautmuskellage, subkutanem
 Fettgewebe und der
 Bindegewebskapsel

Definitionen zur Auswertung

Kapseldicke:

dünn: weniger als 4 Fibrozytenlagen
 mittel: zwischen 4 und 6 Fibrozytenlagen
 dick: mehr als 6 Fibrozytenlagen

Bindegewebsproliferation:

wenig
 mäßig
 stark

Andere Kriterien:

- = nicht vorhanden
 x = vorhanden
 fokal = 1-2 Lokalisationen mit Zell-Ansammlungen
 multifokal = mehr als zwei Lokalisationen mit Zell-
 Ansammlungen

(+) = minimal (ein bis zwei Zellen)
 + = geringgradig (drei bis acht Zellen)
 ++ = mittelgradig (neun bis 14 Zellen)
 +++ = hochgradig (mehr als 14 Zellen)

klein = ein - zehn Erythrozyten
 mittel = elf - 30 Erythrozyten
 groß = über 30 Erythrozyten

Tab. 1: Bioglas

Maus		41/04	42/04
Kapsel			
Kapseldicke		dünn (stellenweise mittel)	dünn
MØ	Zell-Ansammlungen	multifokal + (um optisch leere Vakuolen, z.T. andeutungsweise bindegewebig abgekapselt)	multifokal + (um optisch leere Vakuolen, z.T. andeutungsweise bindegewebig abgekapselt)
	innere Lage	-	-
	mehrere Lagen	-	-
	Riesenzellen	-	-
andere EZ-Zellen und -zeichen		fokal EGR ++, NGR +	-
Sonstiges		multifokal optisch leere Vakuolen, klein-groß, z.T. von granulomat. EZ umgeben (s.o.)	fokal optisch leere Vakuolen, in einem Anschnitt multifokal; klein-groß, z.T. von granulomat. EZ umgeben (s.o.)
Perikapsuläres Gewebe			
Gewebsreaktion		wenig, fokal starke BGW-Proliferation, multifokale mgr.-hgr. MØ-Ansammlungen und bindegewebig abgekapselte Granulome um optisch leere Vakuolen (klein bis groß); hier min. RZ beteiligt Multifokal ggr. LZ und NGR, fokal mgr. EGR	wenig BGW-Proliferation; multifokale ggr. MØ-Ansammlungen und bindegewebig abgekapselte Granulome um optisch leere Vakuolen (klein bis groß); fokale Hämosiderose; multifokal mgr. EGR, fokal min. NGR
Haargranulome		-	fokal: Winkelbereich (+), lockeres Bindegewebe +
Sonstige Bemerkungen/Befunde		-	fokal ggr. MØ u. LZ- im subkutanen FG

Tab. 2: Bioglas Fts.

Maus		43/04	44/04
Kapsel			
Kapseldicke		dünn	dünn (stellenweise mittel)
MØ	Zell-Ansammlungen	multifokal + (um optisch leere Vakuolen, z.T. andeutungsweise bindegewebig abgekapselt)	multifokal + (um optisch leere Vakuolen, z.T. andeutungsweise bindegewebig abgekapselt)
	innere Lage	-	-
	mehrere Lagen	-	-
	Riesenzellen	-	-
andere EZ-Zellen und -zeichen		-	ein <u>Anschnitt</u> : fokal nicht klassifizierbare Zellen ++, fokal NGR +, LZ (+), EGR ++, MZ ++
Sonstiges		fokal optisch leere Vakuolen, klein-mittel, z.T. von granulomat. EZ umgeben (s.o.)	multifokal optisch leere Vakuolen, klein-groß, z.T. von granulomat. EZ umgeben (s.o.)
Perikapsuläres Gewebe			
Gewebsreaktion		mäßige BGW-Proliferation, fokal Kapillaren und Hämosiderin Fokal mgr. MZ und EGR Multifokal mgr. bindegewebig abgekapselte Granulome um optisch leere Vakuolen (klein bis groß), hier minimal auch RZ beteiligt. Min. diffuse Infiltration mit MØ, LZ, NGR,	starke BGW-Proliferation mit multifokaler, mgr. Beteiligung v. EGR Multifokal mgr. bindegewebig abgekapselte Granulome um optisch leere Vakuolen (klein bis groß), hier min. Beteiligung von RZ Fokal ggr. LZ
Haargranulome		fokal: perikapsulär +, Kapsel (+)	lockeres Bindegewebe fokal ++
Sonstige Bemerkungen/Befunde		-	-

Tab. 3: Bioglas Fts.

Maus		45/04	46/04
Kapsel			
Kapseldicke		dünn	dünn
MØ	Zell-Ansammlungen	-	multifokal + (um optisch leere Vakuolen, z.T. andeutungsweise bindegewebig abgekapselt)
	innere Lage	-	-
	mehrere Lagen	-	-
	Riesenzellen	-	-
andere EZ-Zellen und -zeichen		multifokal nicht klassifizierbare Zellen + - ++	<u>ein Anschnitt</u> : fokal nicht klassifizierbare Zellen +
Sonstiges		-	multifokal optisch leere Vakuolen, klein-groß, z.T. von granulomat. EZ umgeben (s.o.)
Perikapsuläres Gewebe			
Gewebsreaktion		wenig BGW-Proliferation Ggr. diffuse Infiltration mit NGR, LZ und PZ; fokal mgr. EGR	wenig bis mäßige BGW-Proliferation; multifokal mgr. bindegewebig abgekapselte Granulome um optisch leere Vakuolen (klein bis groß); hier min. auch RZ beteiligt Fokal mgr. FB, multifokale Kapillarsprossung Multifokale mgr. lymphozytäre Begleitreaktion, fokal ggr. mit PZ Diffus ggr. NGR, mgr. EGR
Haargranulome		Kapsel fokal +	Kapsel fokal (+)
Sonstige Bemerkungen/ Befunde		fokal: ggr. pyogranulomatöse EZ im subkutanem FG, z.T. min. FB	-

Tab. 4: Bioglas Fts.

Maus		47/04	50/04
Kapsel			
Kapseldicke		dünn (stellenweise mittel)	mittel (stellenweise dünn)
MØ	Zell-Ansammlungen	multifokal + (um optisch leere Vakuolen, z.T. andeutungsweise bindegewebig abgekapselt)	multifokal + - ++ (um optisch leere Vakuolen, z.T. andeutungsweise bindegewebig abgekapselt)
	innere Lage	x	x
	mehrere Lagen	x	x
	Riesenzellen	-	-
andere EZ-Zellen und -zeichen		-	-
Sonstiges		multifokal optisch leere Vakuolen, klein-groß, z.T. von granulomat. EZ umgeben; (s.o.)	multifokal optisch leere Vakuolen, klein-groß, z.T. von granulomat. EZ umgeben (s.o.)
Perikapsuläres Gewebe			
Gewebsreaktion		wenig bis mäßige BGW-Proliferation mit multifokalen, ggr. - mgr. bindegewebig abgekapselten Granulome um optisch leere Vakuolen (klein bis groß) Fokal Kapillaren und ggr. NGR, multifokal mgr. FB	starke BGW-Proliferation Fokal mgr. FB, multifokal mgr. bindegewebig abgekapselte Granulome um optisch leere Vakuolen (klein bis groß), hier fokal apoptotische Strukturen und fokal ggr. begleitet v. NGR, LZ. Fokal Kapillarsprossung multifokal mgr. MZ-Ansammlung; fokal ggr. gemischtzellige Infiltration an Grenze QM-BGW
Haargranulome		fokal: Winkelbereich, perikapsulär +	Winkelbereich fokal (+)
Sonstige Bemerkungen/ Befunde		-	-

Tab. 5: Polypropylen Kappenteil

Maus		7/04	8/04	9/04	21/04
Kapsel					
Kapseldicke		dünn (stellenweise mittel)	mittel	mittel (stellenweise dünn, stellenweise dick)	dünn
MØ	Zell-Ansammlungen	-	-	fokal ++ (s.u.)	fokal + (s.u.)
	innere Lage	x	x	x	x
	mehrere Lagen	-	-	-	-
	Riesenzellen	multifokal (+)	-	fokal (+)	multifokal +
andere EZ-Zellen und -zeichen		-	fokal: FB +, NGR +	fokal: Granulationsgewebe: FB ++, NGR (MØ ++), Zelldetritus, multifokal Kapillaren	<u>ein Anschnitt:</u> Granulationsgewebe mit multifokal FB + (MØ ++), LZ +, NGR +, multifokal Kapillaren Fokal nicht klassifizierbare Zellen +
Sonstiges		-	-	-	fokal Hämosiderin
Perikapsuläres Gewebe					
Gewebsreaktion		wenig BGW-Proliferation mit fokaler Hämosiderose, fokale Kapillarsprossung ggr. multifokale gemischtzell. EZ im perikapsulären FG	wenig BGW-Proliferation	wenig bis mäßige BGW Proliferation	wenig bis mäßige BGW-Proliferation, multifokale Kapillarsprossung
Haargranulome		Multifokal: perikapsulär ++, Kapsel +	-	Multifokal: Winkelbereich / Kapsel ++ - +++, lockeres Bindegewebe +	-
Sonstige Bemerkungen/ Befunde		-	-	-	-

Tab. 6: Polypropylen- Kappenteil Fts.

Maus		22/04	23/04	24/04	25/04
Kapsel					
Kapseldicke		dünn (stellenweise mittel)	dünn	dünn	mittel
MØ	Zell-Ansammlungen	multifokal +- ++ (s. auch unten)	-	fokal +	multifokal + - ++
	innere Lage	x	x	x	x
	mehrere Lagen	-	-	-	-
	Riesenzellen	-	-	fokal +	fokal +
andere EZ-Zellen und -zeichen		diffuse Granulationsgewebs-Bildung: FB ++, NGR, LZ +, (MØ ++) Zelldetritus	fokal FB +	fokal andeutungsweise Granulationsgewebe: FB+, NGR (+) Fokal nicht klassifizierbare Zellen +	multifokal FB+, NGR und LZ + - ++, fokal Zelldetritus Fokal nicht klassifizierbare Zellen (+)
Sonstiges		fokal Hämosiderin	multifokal Hämosiderin	fokal Hämosiderin	-
Perikapsuläres Gewebe					
Gewebsreaktion		wenig BGW-Proliferation mit multifokaler Kapillarsprossung	wenig BGW-Proliferation mit fokaler Kapillarsprossung und fokaler Hämosiderose; fokal ggr. pyogranulomat. EZ im FG perikapsulär	mäßige BGW-Proliferation mit multifokaler Kapillarsprossung und diffuser, hgr. FB-Beteiligung	wenig BGW-Proliferation mit ggr. multifokaler FB-Infiltration
Haargranulome		-	fokal Kapsel +	multifokal lockeres Bindegewebe ++	multifokal: Kapsel (+), Winkelbereich ++
Sonstige Bemerkungen/ Befunde		-	-	ggr. diffuse gemischtzellige EZ im FG und BGW	-

Tab. 7: Polypropylen Bioglasteil

Maus		7/04	8/04	9/04	21/04
Kapsel					
Kapseldicke		dünn	dünn (stellenweise mittel)	dünn	mittel (stellenweise dünn)
MØ	Zell-Ansammlungen	-	-	-	-
	innere Lage	x	-	-	x
	mehrere Lagen	-	-	-	-
	Riesenzellen	+	-	-	-
andere EZ-Zellen und -zeichen		-	-	fokal nicht klassifizierbare Zellen (+)	-
Sonstiges		-	fokal Hämosiderin	fokal Hämosiderin	
Perikapsuläres Gewebe					
Gewebsreaktion		wenig BGW-Proliferation, fokal Kapillaren	wenig BGW-Proliferation	wenig - mäßige BGW-Proliferation	wenig - mäßige BGW-Proliferation; fokal min. MØ <u>Ein Anschnitt:</u> multifokal mgr. FB
Haargranulome		multifokal: Kapsel, Winkelbereich ++ - +++	-	multifokal: Kapsel ++, perikapsuläres BGW ++ - +++	-
Sonstige Bemerkungen/ Befunde		-	-	-	-

Tab. 8: Polypropylen Bioglasteil Fts.

Maus		22/04	23/04	24/04	25/04
Kapsel					
Kapseldicke		dünn	dünn	dünn (stellenweise mittel)	dünn (stellenweise mittel)
MØ	Zell-Ansammlungen	-	-	<u>ein Anschnitt</u> : multifokal ++ (s.u.)	-
	innere Lage	x	-	x (ein Anschnitt)	x
	mehrere Lagen	-	-	-	-
	Riesenzellen	-	-	-	-
andere EZ-Zellen und -zeichen		fokal nicht klassifizierbare Zellen (+); <u>ein Anschnitt</u> : fokal FB ++, NGR +	-	<u>ein Anschnitt</u> : fokal Granulationsgewebe: FB ++, NGR ++	fokal nicht klassifizierbare Zellen +
Sonstiges		fokal Hämosiderin	-	multifokal Hämosiderin	-
Perikapsuläres Gewebe					
Gewebsreaktion		wenig - mäßige BGW-Proliferation	wenig BGW-Proliferation	starke BGW-Proliferation, diffus hgr. FB-Infiltration und multifokale Kapillarsprossen; diffuse, ggr. gemischtzellige EZ (PZ, LZ, NGR)	wenig - mäßige BGW-Proliferation, diffuse, mgr. Infiltration mit FB
Haargranulome		multifokal: Kapsel (+), BG ++	multifokal: Kapsel ++ - +++ BG, Winkelbereich ++	Winkelbereich fokal (+)	multifokal: Kapsel, Winkelbereich, BG +
Sonstige Bemerkungen/ Befunde		-	-	diffuse ggr.- mgr. gemischtzellige EZ, multifokale Nervenanschnitte	-

Tab. 9: Parylene C

Maus		31/04	32/04	33/04
Kapsel				
Kapseldicke		dünn (stellenweise mittel)	mittel (stellenweise dünn)	dünn (stellenweise mittel)
MØ	Zell-Ansammlungen	fokal + (um Fremdmaterial)	-	-
	innere Lage	x	x	x
	mehrere Lagen	-	-	-
	Riesenzellen	-	-	-
andere EZ-Zellen und -zeichen		-	fokal nicht klassifizierbare Zellen (+)	-
Sonstiges		fokal kleine, transparente, doppelbrechender FK fokal Hämosiderin	-	-
Perikapsuläres Gewebe				
Gewebsreaktion		wenig BGW-Proliferation; <u>ein Anschnitt</u> : diffus mgr. FB und fokal Kapillaren; fokale Hämosiderose	wenig BGW-Proliferation; im lockeren BGW multifokale ggr. mononukleäre Infiltrate. Fokal RZ mit kleinem, transparentem, doppelbrechendem FK	wenig - mäßige BGW-Proliferation Multifokal ggr. Granulome und RZ um transparente, doppelbrechende FK (Größe klein bis mittel)
Haargranulome		Kapsel fokal +	lockeres Bindegewebe fokal (+)	multifokal: Winkelbereich (+), Kapsel +
Sonstige Bemerkungen/ Befunde		-	im subkutanen FG multifokal ggr. pyogranulomatöse EZ	multifokal ggr. lymphozytäre Infiltrate um Milchgänge

Tab. 10: Parylene C Fts.

Maus		34/04	35/04	36/04	37/04
Kapsel					
Kapseldicke		mittel	dünn (stellenweise mittel)	mittel (stellenweise dünn)	dünn (stellenweise mittel)
MØ	Zell-Ansammlungen	-	-	-	-
	innere Lage	x	-	x	x
	mehrere Lagen	-	-	-	-
	Riesenzellen	-	-	-	fokal +
andere EZ-Zellen und -zeichen		fokal nicht klassifizierbare Zellen (+)	-	-	-
Sonstiges		-	-	-	fokal Hämosiderin
Perikapsuläres Gewebe					
Gewebsreaktion		wenig BGW-Proliferation	mäßige BGW-Proliferation, fokal Kapillarsprossen, multifokal Hämosiderin Multifokal mgr. FB im BGW	wenig BGW-Proliferation, multifokal Kapillaren. Fokal min. Infiltration mit NGR Fokale Hämosiderose, fokal mgr. Granulom (mit RZ und bindegewebiger Abkapselung) um großen, transparenten, doppelbrechenden FK	wenig BGW-Proliferation, fokale, min. MØ-Ansammlung im Winkelbereich
Haargranulome		Winkelbereich fokal (+)	multifokal: Winkelbereich ++, Kapsel (+)	-	Winkelbereich fokal (+)
Sonstige Bemerkungen/Befunde		im subkutanen FG multifokal ggr. pyogranulomatöse EZ	-	-	dilatierte sekretgefüllte Milchgänge, z.T. verkalkt

Tab. 11: Parylene C Fts.

Maus		38/04	39/04	40/04
Kapsel				
Kapseldicke		mittel (stellenweise dünn)	dünn (stellenweise mittel)	mittel (stellenweise dünn)
MØ	Zell-Ansammlungen	-	-	-
	innere Lage	x	x	x
	mehrere Lagen	-	-	-
	Riesenzellen	-	-	-
andere EZ-Zellen und -zeichen		fokal nicht klassifizierbare Zellen +	-	fokal nicht klassifizierbare Zellen (+)
Sonstiges		transparente, doppelbrechende kleine Fremdkörperpartikel ohne sichtbare Reaktion	-	<u>ein Anschnitt</u> : multifokal Hämosiderin
Perikapsuläres Gewebe				
Gewebsreaktion		wenig BGW-Proliferation, fokal Kapillarsprossen, fokal mgr. MZ; diffuse ggr. gemischtzellige Infiltration im BGW	wenig BGW-Proliferation ggr. multifokal gemischtzellige Infiltrate; fokal Kapillaren	wenig BGW-Proliferation, fokal Kapillaren, fokal ggr. NGR multifokal ggr. MØ-Ansammlung um kleinen, transparenten, doppelbrechenden FK in perikapsulären BGW-Zügen
Haargranulome		-	multifokal: Winkelbereich, perikapsulär +	multifokal: lockeres BGW +, Kapsel ++
Sonstige Bemerkungen/ Befunde		-	kleiner, transparenter, doppelbrechender FK ohne sichtb. EZ Fokal ggr. NGR in Dermis	subkutanes FG: fokal ggr LZ, NGR

Tab. 12: Titan

Maus		11/04	12/04	13/04
Kapsel				
Kapseldicke		mittel	mittel	mittel (stellenweise dünn)
MØ	Zell-Ansammlungen	-	fokal + (um Fremdmaterial, s.u.)	-
	innere Lage	x	x	-
	mehrere Lagen	-	-	-
	Riesenzellen	-	-	-
andere EZ-Zellen und -zeichen		-	-	fokal nicht klassifizierbare Zellen +
Sonstiges		-	multifokal schiefergraue kleine Fremdpartikel (leicht doppelbrechend an Rändern), z.T. von MØ umgeben	-
Perikapsuläres Gewebe				
Gewebsreaktion		mäßige BGW-Proliferation mit multifokalen Kapillarsprossen	wenig BGW-Proliferation, fokal min. LZ	wenig BGW-Proliferation
Haargranulome		-	-	-
Sonstige Bemerkungen/ Befunde		mgr. diffuse lymphoplasmazell. Steatitis/ Mastitis	-	-

Tab. 13: Titan Fts.

Maus		14/04	15/04	16/04
Kapsel				
Kapseldicke		dünn (stellenweise mittel)	mittel	dünn (stellenweise mittel)
MØ	Zell-Ansammlungen	multifokal + (RZ und andeutungsweise bindegewebige Abkapselung um Fremdmaterial (s.u.); dieses z.T. intrazellulär in MØ)	-	-
	innere Lage	x	x	x
	mehrere Lagen	-	-	-
	Riesenzellen	multifokal ++	-	-
andere EZ-Zellen und -zeichen		-	-	-
Sonstiges		multifokal schiefergraue kleine Fremdpartikel (leicht doppelbrechend an Rändern), von granulomat. EZ umgeben	-	-
Perikapsuläres Gewebe				
Gewebsreaktion		wenig BGW-Proliferation, multifokal Kapillarsprossen im Perineurium	wenig BGW-Proliferation fokal ggr. MØ, multifokal ggr. PZ und NGR perikapsulär	wenig - mäßige BGW-Proliferation, ggr. fokale MØ-Ansammlung perikapsulär Diffuse, min. gemischtzell. Infiltration (NGR, PZ, LZ) und multifokal ggr. FB
Haargranulome		-	-	multifokal: perikapsulär, lockeres BGW +
Sonstige Bemerkungen/ Befunde		fokal pyogranulomat. EZ in subkutanem FG	ggr. multifokale lymphoplasmahistiozytäre EZ mit ggr. Fibrosierung im FG	-

Tab. 14: Titan Fts.

Maus		17/04	18/04
Kapsel			
Kapseldicke		mittel	mittel (stellenweise dünn)
MØ	Zell-Ansammlungen	fokal (+) um Fremdmaterial	-
	innere Lage	x	-
	mehrere Lagen	-	-
	Riesenzellen	-	-
andere EZ-Zellen und -zeichen		fokal nicht klassifizierbare Zellen + - ++	fokal nicht klassifizierbare Zellen (+) - ++
Sonstiges		fokal Spuren von schiefergrauem Fremdmaterial, z.T. von MØ umgeben	-
Perikapsuläres Gewebe			
Gewebsreaktion		wenig – mäßige BGW-Proliferation; <u>ein Anschnitt</u> : diffus FB ++ und EGR ++	wenig BGW-Proliferation; <u>ein Anschnitt</u> : mäßige BGW-Proliferation; dort diffus hgr. FB und fokal ggr. LZ, multifokal Kapillarsprossen
Haargranulome		fokal perikapsulär (+)	-
Sonstige Bemerkungen/Befunde		fokale ggr. pyogranulomat. EZ in subkutanem FG	fokale ggr. pyogranulomatöse EZ im FG

Tab. 15: Titan Fts.

Maus		19/04	20/04
Kapsel			
Kapseldicke		mittel (stellenweise dick)	dünn (stellenweise mittel)
MØ	Zell-Ansammlungen	-	multifokal ++ (um Fremdmaterial (s.u.), z.T. mit RZ; Material z.T. intrazellulär in MØ)
	innere Lage	-	x
	mehrere Lagen	-	-
	Riesenzellen	-	multifokal (+)
andere EZ-Zellen und -zeichen		multifokal FB+ fokal nicht klassifizierbare Zellen +---	multifokal FB+ fokal nicht klassifizierbare Zellen ++ fokal LZ +
Sonstiges		-	multifokal schiefergraue kleine Fremdpartikel (leicht doppelbrechend an Rändern), z.T. von MØ umgeben (s.o.)
Perikapsuläres Gewebe			
Gewebsreaktion		wenig BGW-Proliferation multifokal ggr. mononukleäre Infiltrate, perikapsulär fokal min. MØ-Infiltration	wenig - mäßige BGW-Proliferation, multifokal ggr. FB, multifokale Kapillarsprossung; fokal kleine schiefergraue Fremdpartikel im BGW mit min. MØ in Umgebung
Haargranulome		-	-
Sonstige Bemerkungen/Befunde		-	-

Tab. 16: Aluminiumoxyd

Maus		2/04	3/04	4/04	26/04
Kapsel					
Kapseldicke		dick	mittel	mittel (stellenweise dünn)	mittel
MØ	Zell-Ansammlungen	-	multifokal ++	multifokal ++	fokal +
	innere Lage	x	-	x	-
	mehrere Lagen	x	-	-	-
	Riesenzellen	-	-	-	-
andere EZ-Zellen und -zeichen		multifokal LZ ++, diffus EGR +, fokal ++ Diffus FB ++, fokal Kapillaren multifokal nicht klassifizierbare Zellen ++	-	fokal LZ ++ multifokal nicht klassifizierbare Zellen +	fokal FB+
Sonstiges		-	-	fokal Hämosiderin	fokal Hämosiderin
Perikapsuläres Gewebe					
Gewebsreaktion		mäßige BGW-Proliferation, multifokal Kapillarsprossung; diffus mgr. EGR und FB, fokal ggr. MØ	wenig - mäßige BGW-Proliferation, fokal Kapillaren; <u>ein Anschnitt</u> : diffus mgr. EGR und FB, fokal ggr. NGR, fokal mgr. MZ	starke BGW-Proliferation, fokal Kapillaren; fokal ggr. bindegewebig abgekapselte Granulome im lockeren Bindegewebe um optisch leere Hohlräume unterschiedl. Größe (klein-mittel), ggr. mit EGR und NGR	wenig BGW-Proliferation, fokal Kapillaren, min. fokal MØ, diffus ggr. NGR
Haargranulome		-	-	-	fokal Kapsel +
Sonstige Bemerkungen/Befunde		-	ggr. multifokale pyogranulomat. EZ im subkutanen FG	-	-

Tab. 17: Aluminiumoxyd Fts.

Maus		27/04	28/04	30/04
Kapsel				
Kapseldicke		mittel	mittel (stellenweise dick, stellenweise dünn)	mittel
MØ	Zell-Ansammlungen	-	multifokal +	fokal +
	innere Lage	x	x	-
	mehrere Lagen	-	x	-
	Riesenzellen	-	-	-
andere EZ-Zellen und -zeichen		-	fokal: EGR ++, FB +, LZ +, Kapillaren + fokal nicht klassifizierbare Zellen ++	fokal nicht klassifizierbare Zellen +
Sonstiges		-	-	-
Perikapsuläres Gewebe				
Gewebsreaktion		mäßige BGW-Proliferation fokal min. MØ <u>ein Anschnitt</u> : hgr. BGW-Proliferation, diffus hgr. FB, multifokal hgr. EGR und MZ, auch multifokal Kapillarsprossen	mäßige BGW-Proliferation, multifokal mgr. FB Fokal ggr. PZ	wenig BGW-Proliferation, fokal Kapillaren <u>ein Anschnitt</u> : starke BGW-Proliferation, diffus mgr. FB, MZ, fokal ggr. NGR
Haargranulome		-	-	-
Sonstige Bemerkungen/ Befunde		-	-	-

9.2 Chemikalien, Lösungen, Puffer, Medien

9.2.1 Formalin

- 4 g Natriumdihydrogenphosphat (Natriumdihydrogenphosphat cryst. purum p.a., Fa. Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz) und
- 6,5 g Dinatriumhydrogenphosphat (di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat zur Analyse, Fa. Merck KGaA, Darmstadt)
- lösen in 900 ml Aqua dest.
- Zugabe von 100 ml Formalin (Formaldehyd säurefrei > 37%, Fa. Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe)
- pH-Wert ca. 7,0

9.2.2 Chemikalien zur Hämatoxylin-Eosin-Färbung

- **Xylol** (Xylol (Isomere) > 98%, Fa. Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe)
- **2-Propanol** (2-Propanol, Fa. Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe)
- **Ethanol** (Ethanol > 99,8% Rotipuran[®], Fa. Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe)
 - jeweilige Verdünnungsstufen mit Aqua dest.
- **Kardasewitsch-Lösung**
 - Ammoniaklösung 25% (Fa. Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe); verdünnt auf 5% mit 70%igem Ethanol
- **Hämatoxylin** (Papanicolaous-Lösung 1b Hämatoxylinlösung S, Fa. Merck KGaA, Darmstadt)
- **HCl-Alkohol**
 - 30 ml 3%iger HCl-Alkohol
 - Salzsäure (Salzsäure 2M, Fisher Scientific UK Limited, Loughborough, Leicestershire, Großbritannien) verdünnt in 70% Ethanol
 - 524 ml Aqua dest.
 - 576 ml 96% Ethanol

– **Eosin-Gebrauchslösung**

- 300 ml Stammlösung
 - 20 g Eosin (Eosin, Fa. Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) gelöst in
 - 1000 ml Aqua dest.
 - 1000 ml 2-Propanol
- 300 ml Aqua dest.
- 300 ml Ethanol 96%
- ca. 1 ml Essigsäure (Essigsäure Rotipuran[®] > 99,7%, Fa. Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe)

9.2.3 Zellkulturmedium

DMEM High Glucose (4,5 g/l) with Glutamine, Fa. PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

je 500 ml wurden hinzugegeben:

- 5,5 ml Penicillin/Streptomycin (10.000 U/10mg in normal saline, Fa. PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- 0,5 ml Gentamicin (Gentamicin solution, 50 mg/ml, Fa. PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- 56 ml Fetales Kälberserum (Foetal Bovine Serum, Fa. PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)

Spüllösung

Zusammensetzung wie Zellkulturmedium, allerdings ohne Fetales Kälberserum

9.2.4 Chemikalien zur rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung

Cacodylatpuffer

Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat Pufferan[®] $\geq 98\%$, Fa. Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

a. **Stammlösung:**

21,4 g Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat, gelöst in 1000 ml Aqua dest.

b. **Gebrauchslösung:**

500 ml Stammlösung + 41,5 ml 0,1 n HCl, auffüllen mit Aqua dest. auf 1000 ml, pH-Wert ca. 7,4

Glutaraldehyd 2,5%

Glutaraldehyd 25% EM Grade, Fa. Agar Scientific Ltd., Essex, Großbritannien, 1:10 verdünnt in Cacodylat-Puffer Gebrauchslösung

Osmiumtetroxid-Lösung 1%

Osmiumtetroxid-Lösung 2%, Fa. Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, 1:1 verdünnt in Cacodylat-Puffer Gebrauchslösung

Graphitkleber

Colloidal Graphite, Isopropanol base, Fa. Taab Laboratories Equipment Ltd., Aldermaston, Berkshire, Großbritannien

9.3 Protokoll zur Zellkulturversorgung

Passagierung

Die Zellkulturflaschen (Iwaki brand, Scitech Division of Asahi Techno Glass Corporation, Tokio, Japan) wurden makro- und mikroskopisch auf Farbveränderungen und Trübung des Mediums hin untersucht, außerdem wurde die Dichte des Zellrasens, die Zellanordnung und -morphologie überprüft. Die Befunde wurden protokolliert.

Anschließend wurden die Zellkulturflaschen unter die Sicherheitswerkbank verbracht.

Alle benötigten Flüssigkeiten wurden im Wasserbad auf 37°C gewärmt.

Die Zellkulturflaschen hatten eine Kulturoberfläche von 25 cm².

Weitere Schritte:

- Entfernung des Zellkulturmediums mit Hilfe einer mit einer Absaugpumpe (Vacuboy[®], Fa. Tecnomara GmbH, Fernwald) verbundenen Pasteurpipette
- Waschen der Zellkultur mit 3 ml Spüllösung
- Absaugen
- Zugabe von 3 ml Trypsin (Trypsin-EDTA, Fa. ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA)
- Inkubation für ca. 5 Minuten im Brutschrank bei 37°C
- Zugabe von 3 ml Zellkulturmedium, Aufnahme der 6 ml Flüssigkeit mit einer Glaspipette und Ablassen in ein Reagenzglas
- Zugabe von 5 ml Zellkulturmedium in die Zellkulturflasche, Ablage in Brutschrank; diese Kultur wurde als „Mutterpassage“ weiterbebrütet.
- Zentrifugation der Zellsuspension im Reagenzglas bei 1600 UpM und 12°C für 5 Minuten
- Absaugen des Überstands
- Zugabe von 3 ml Zellkulturmedium, vorsichtiges Resuspendieren der Zellen mit einer Glaspipette
- Einträufeln von zwei bis drei Tropfen der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche
- Zugabe von 5 ml Zellkulturmedium, Ablage der Zellkulturflasche im Brutschrank

Die Passagierung erfolgte einmal pro Woche. In dieser Zeit hatten beide Zelllinien einen gleichmäßigen Monolayer gebildet. Die Zellkonzentration betrug für beide verwendeten Zelllinien nach einwöchiger Inkubation ca. 3-4 Millionen Zellen/ml.

Pflege der Zellkultur

Drei bis vier Tage nach der Passagierung wurden die Zelllinien makro- und mikroskopisch wie oben beschrieben überprüft und die Befunde protokolliert. Gegebenenfalls wurde das Zellkulturmedium gewechselt.

Zur Passagierung und Pflege der Zellkulturen wurden weiterhin verwendet:

- Sicherheitswerkbank (LaminAir, Fa. Heraeus Instruments/ Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold)
- Flächendesinfektionsmittel: 70% Ethanol oder Barrycidal[®]36, DROL Laborgeräte & Zubehör Dr. Otto Lorey, Reichertshausen
- Händedesinfektionsmittel (Wofasept[®]AH, Kesla Chemie GmbH - Pharma Wolfen, Wolfen)
- Einmal-Handschuhe (Semperguard Latex powderfree, Fa. Semperit Technikprodukte GmbH & Co KG, Wien, Österreich)
- Abflammgerät (Fireboy[®], Fa. Tecnomara GmbH, Fernwald)

9.4 Bezugsquellen

Agar Scientific Ltd., Essex, Großbritannien

Glutaraldehyd 25% EM Grade

Balzers Union Ltd., Liechtenstein

Sputter Anlage

Business Inception Identification B.V., Otterlo, Niederlande

Bioglas-Transponder mit Parylene C-Beschichtung inkl. Einmal-Injektionssystem

Cadillac Plastic GmbH Kunststoff-Halbzeuge, Sulzbach

Polysterol weiß

Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

1-Propanol > 99,5%ig

2-Propanol

Ammoniaklösung 25%

Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat Pufferan[®] ≥98%

Eosin

Essigsäure Rotipuran[®] > 99,7%

Ethanol > 99,8% Rotipuran[®]

Formaldehyd säurefrei > 37%

Osmiumtetroxid-Lösung 2%

Xylol (Isomere) > 98%

Carl Zeiss AG, Oberkochen

DSM 940 (Rasterelektronenmikroskop)

Datamars S.A., Bedano-Lugano, Schweiz

Bioglas-Transponder inkl. Einmal-Injektionssystem

Digital Angel Corporation, South St. Paul, USA

Bioglas-Transponder mit Polypropylenkappe inkl. Einmal-Injektionssystem

DROL Laborgeräte & Zubehör Dr. Otto Lorey, Reichertshausen

Barrycidal®36 (Flächendesinfektionsmittel)

Fisher Scientific UK Limited, Loughborough, Leicestershire, Großbritannien

Salzsäure 2M

Wasserbad Typ 3047

Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

Natriumdihydrogenphosphat cryst. purum p.a.

H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim

Varioklav Dampfsterilisator Typ 250T

Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln

NMRI-Mäuse zur pathologisch-morphologischen Bestandsuntersuchung

Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Kelheim

RE AX 1 DR (Vortexer)

Heraeus Instruments/ Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold

FunctionLine (Brutschrank)

LaminAir (Sicherheitswerkbank)

Hettich-Zentrifugen GmbH, Tuttlingen

Rotina 48 RC

ICN Biomedicals, Inc., Aurora, USA

Trypsin-EDTA

Kesla Chemie GmbH - Pharma Wolfen, Wolfen

Wofasept[®] AH (Händedesinfektionsmittel)

Merck KGaA, Darmstadt

di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat zur Analyse

Papanicolaous-Lösung 1b Hämatoxylinlösung S

Kieselgel mit Feuchtigkeitsindikator (Blaugel)

Messer Group GmbH, Sulzbach

Steigrohr-CO₂ flüssig

Nunc, Roskilde, Dänemark

Nunclon (Zellkulturflaschen)

PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

DMEM High Glucose (4,5 g/l) with Glutamine

Penicillin/Streptomycin (10.000 U/10 mg in normal saline)

Gentamicin solution, 50 mg/ml

Foetal Bovine Serum

Planet ID GmbH, Essen

Breeder Reader[®] (Lesegerät)

Bioglas-Transponder mit Beschichtungen aus Titan und Aluminiumoxyd

Bioglas-Transponder

Bioglas-Transponder mit Silikonkleber

Transponderinjektor nach Hüther

Spritzeninjektor

Plano GmbH, Wetzlar

Stiftprobenteller

Polaron Equipment Limited, Watford, Hertfordshire, Großbritannien

E3000 Series II (Apparat zur Kritischen-Punkt-Trocknung)

Scitech Division of Asahi Techno Glass Corporation, Tokio, Japan

Iwaki brand (Zellkulturflaschen)

Semperit Technikprodukte GmbH & Co KG, Wien, Österreich

Semperguard Latex powderfree (Einmal-Handschuhe)

Taab Laboratories Equipment Ltd., Aldermaston, Berkshire, Großbritannien

Colloidal Graphite, Isopropanol base

Tecnomara GmbH, Fernwald

Vacuboy[®] (Vakuumpumpe)

Fireboy[®] (Abflammgerät)

Vogel Wilhelm GmbH, Gießen

Tissue Tek[®] Vacuum Infiltration Processor (Einbettungsautomat)

Histo-Comp[®] Gewebeeinbettmittel

9.5 Abbildungsverzeichnis

Abb. Nr.	Beschreibung	Bemerkung	Vergrößerung
Literaturverzeichnis			
1	TP mit PP-Kappe	REM	10x
2	Strukturformel Parylene C	Skizze	
Material und Methoden			
3	Gewebequader mit TP, noch an Maus befindlich	Foto	
4	Entfernung TP aus Gewebequader	Foto	
5	Stück von Gewebequader ohne TP, quer	Foto	
6	Zellkulturflasche mit TP am Ende der Flasche	Skizze	
7	Polysterolständer mit TP	Skizze	
8	Zellkulturflasche mit TP am Ende der Flasche, aufgeschnittener Bereich markiert	Skizze	
9	TP im Polysterolständer, Markierung der Auflagefläche und des berührten Abschnitts	Skizze	
10	Auswertbarer Bereich eines TP im REM	REM	20x
Ergebnisse			
11	zwei AL-TP: unbenutzt und nach Entfernung aus Gewebe	Foto	
12	Kontrollprobe Haut, Übersicht	Lichtmikroskop	10x
13	Kontrollprobe Haut, EGR + MZ	Lichtmikroskop	40x
14	Kontrollprobe Haut, pyogranulomatöser Herd in Subkutis	Lichtmikroskop	40x
15	Haut mit Transponderhöhle, Übersicht BGW-Kapsel	Lichtmikroskop	2,5x
16	BGW-Kapsel	Lichtmikroskop	40x
17	MØ an der TP-Seite der BGW-Kapsel	Lichtmikroskop	40x
18	MØ an der TP-Seite der BGW-Kapsel	Lichtmikroskop	100x
19	Mehrkernige RZ an der TP-Seite der BGW-Kapsel	Lichtmikroskop	100x
20	Übersicht BGW-Kapsel mit unterschiedlichen Kapseldicken	Lichtmikroskop	10x
21	Ausschnittsvergrößerung von Abb. 20, dicker Kapselabschnitt	Lichtmikroskop	40x
22	Ausschnittsvergrößerung von Abb. 20, dünner Kapselabschnitt	Lichtmikroskop	40x
23	Abschnitt der BGW-Kapsel mit nicht klassifizierbaren Zellen	Lichtmikroskop	40x
24	Wenig BGW-Proliferation im Winkelbereich	Lichtmikroskop	2,5x
25	Mäßige BGW-Proliferation im Winkelbereich	Lichtmikroskop	2,5x
26	Starke BGW-Proliferation im Winkelbereich	Lichtmikroskop	2,5x

Abb. Nr.	Beschreibung	Bemerkung	Vergrößerung
27	Kein Winkelbereich vorhanden	Lichtmikroskop	2,5x
28	BGW-Kapsel mit Mastzellen	Lichtmikroskop	40x
29	BG: hgr. granulomatöse EZ um optisch leere Hohlräume	Lichtmikroskop	10x
30	BG: BGW-Kapsel mit mehreren Lagen MØ	Lichtmikroskop	40x
31	BG: Granulom um optisch leere Hohlräume, apoptotischen Strukturen	Lichtmikroskop	40x
32	BG: RZ und EZ im lockeren BGW	Lichtmikroskop	40x
33	BG: unregelmäßige BGW-Kapsel mit optisch leeren Hohlräumen	Lichtmikroskop	40x
34	BG: Granulom mit RZ um optisch leere Hohlräume	Lichtmikroskop	40x
35	PP: BGW-Kapsel mit diffuser Granulationsgewebsbildung	Lichtmikroskop	10x
36	PP: Ausschnittsvergrößerung von Abb. 35	Lichtmikroskop	40x
37	PP: Präparat von Abb. 35 und 36, Gewebe um Bioglasteil, kein Granulationsgewebe	Lichtmikroskop	2,5x
38	PP: BGW-Kapsel mit fokaler Granulationsgewebsbildung	Lichtmikroskop	10x
39	PP: BGW-Kapsel und perikapsuläres Gewebe mit Granulationsgewebe	Lichtmikroskop	40x
40	PP: BGW-Kapsel mit Haargranulomen	Lichtmikroskop	40x
41	PP: Haargranulome im lockeren BGW	Lichtmikroskop	40x
42	PA: BGW-Kapsel mit granulomatöser EZ um doppelbrechendes Fremdmaterial	Lichtmikroskop	40x
43	PA: doppelbrechendes Fremdmaterial in mehrkerniger RZ perikapsulär	Lichtmikroskop	40x
44	Ti: BGW-Kapsel ohne EZ	Lichtmikroskop	40x
45	Ti: BGW-Kapsel mit granulomatöser EZ um schiefergraue Fremdpartikel	Lichtmikroskop	40x
46	Ti: schiefergraues Fremdmaterial in einem MØ	Lichtmikroskop	100x
47	AL: unregelmäßige BGW-Kapsel mit Entzündungszellen	Lichtmikroskop	10x
48	AL: Ausschnittsvergrößerung von Abb. 47	Lichtmikroskop	40x
49	AL: unregelmäßige BGW-Kapsel mit EGR	Lichtmikroskop	40x
50	AL: Ausschnittsvergrößerung von Abb. 49	Lichtmikroskop	100x
51	AL: BGW-Kapsel mit MØ und LZ	Lichtmikroskop	40x
52	BG-TP aus Maus, inselartige Gewebe- und Faserreste	REM	100x
53	AL-TP aus Maus, inselartige Gewebe- und Faserreste	REM	100x
54	PP-TP aus Maus, inselartige Gewebe- und Faserreste	REM	200x
55	Ti-TP aus Maus, inselartige Gewebe- und Faserreste	REM	500x
56	Kontrolle FS I: Mitte der Zellkulturflasche	GKM	10x
57	Kontrolle FS I: Rand der Zellkulturflasche	GKM	20x

Abb. Nr.	Beschreibung	Bemerkung	Vergrößerung
58	Kontrolle FS VI: Mitte der Zellkulturflasche	GKM	10x
59	Kontrolle FS VI: Rand der Zellkulturflasche	GKM	10x
60	Kontrolle FS VI	REM	500x
61	Kontrolle FS I	REM	500x
62	BG, FS I: minimale Zellrasendichte um TP, Zellen erscheinen abgerundet	GKM	10x
63	BG, FS I: bläschenhaltige Masse, keine Zellen	REM	100x
64	BG, FS VI: vereinzelte Zellen	REM	500x
65	PP, FS I: hohe bis sehr hohe Zellrasendichte um TP	GKM	10x
66	PP, FS I: Unebenheiten, keine Zellen	REM	100x
67	PP, FS I: wenige Zellen auf BG-Abschnitt	REM	100x
68	PP, FS VI: mäßig Zellen	REM	100x
69	PP, FS VI: mäßig Zellen auf BG-Abschnitt	REM	100x
70	PA, FS I: Unebenheiten, wenige Zellen	REM	200x
71	PA, FS I: Unebenheiten, eine Zelle	REM	1000x
72	PA, FS VI: mäßig bis viele Zellen	REM	100x
73	Ti, FS I: hohe bis sehr hohe Zellrasendichte um TP	GKM	20x
74	Ti (autoklaviert), FS VI: mittlere Zellrasendichte um TP	GKM	10x
75	Ti, FS I: dichter Zellverband	REM	100x
76	Ti, FS I: Ausschnittsvergrößerung von Abb. 75	REM	200x
77	Ti (autoklaviert), FS I: mäßige Zellzahl	REM	100x
78	Ti, FS VI: mäßig bis viele Zellen	REM	200x
79	Ti (autoklaviert), FS VI: viele Zellen, deutlicher Verband	REM	200x
80	AL, FS I: Mitte der Zellkulturflasche, hohe Zellrasendichte	GKM	10x
81	AL, FS I: hinteres Viertel der Zellkulturflasche aus Abb. 80, Zellrasendichte nimmt deutlich ab	GKM	10x
82	AL, FS I: minimale Zellrasendichte um TP	GKM	10x
83	AL (autoklaviert), FS VI: minimale Zellrasendichte um TP	GKM	10x
84	AL, FS VI: unregelmäßige Oberfläche, keine Zellen	REM	200x
85	AL (autoklaviert), FS I: unregelmäßige Oberfläche, keine Zellen	REM	200x
86	Vorversuch, AL (autoklaviert), FS I: wenige Zellen auf dem TP	REM	1000x
87	Vorversuch, Kontrolle FS I	REM	100x
88	Vorversuch, PA, FS I: Stelle mit mäßiger Zellzahl	REM	200x
89	Vorversuch, Ti (autoklaviert), FS I: viele Zellen, enger Zellverband	REM	200x

Abb. Nr.	Beschreibung	Bemerkung	Vergrößerung
90	Vorversuch, PP, FS I: Unebenheiten, mäßige Zellzahl	REM	200x
91	Bioglas-Untersuchung, Kontrolle, FS I: mittlere Zellrasendichte am Flaschenrand	GKM	10x
92	Bioglas-Untersuchung, Kontrolle FS VI: geringe bis mittlere Zellrasendichte am Flaschenrand	GKM	10x
93	Bioglas-Untersuchung, BG, FS I: geringe Zellrasendichte um den Transponder	GKM	10x
94	Bioglas-Untersuchung, SI, FS VI: mittlere Zellrasendichte um den Transponder	GKM	10x
95	Bioglas-Untersuchung, BG2, FS I: mittlere Zellrasendichte um den Transponder	GKM	10x
96	Bioglas-Untersuchung, Kontrolle, FS I	REM	200x
97	Bioglas-Untersuchung, Kontrolle, FS VI	REM	200x
98	Bioglas-Untersuchung, SI, FS VI: Stelle mit mäßiger Zellzahl	REM	200x
99	Bioglas-Untersuchung, BG, FS I: Stelle mit wenigen Zellen	REM	200x
100	Bioglas-Untersuchung, BG2, FS I: Stelle mit vielen Zellen	REM	200x
Diskussion			
101	Generelle Schritte der Fremdkörper-Reaktion aus: RATNER, 2002	Schema	
102	Übersicht zur Pathogenese der Migration/Wanderung	Schema	

Erklärung nach Promotionsordnung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen vom 6. Februar 2002, §10 (5):

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Reinacher für die Überlassung des Themas und für seine freundliche Betreuung in fachlicher und in persönlicher Hinsicht. Durch seine Gelassenheit und seine Geduld wurde ich des Öfteren auf den Boden der Tatsachen zurückgeholt, das war sehr hilfreich.

Ich bedanke mich auch bei Dr. Sven Hütter, der mir mit Rat und Tat zur Seite stand.

Das vorliegende Thema hat meiner Meinung nach ideal zu mir gepasst. Es ist eine Doktorarbeit zum Anfassen.

Recht herzlich danke ich dem fachlich-technischen Personal des Instituts für Veterinär-Pathologie. Ohne die Hilfe von Sabine Krauskopf und Harthmut Grimm – um nur zwei zu nennen - wäre ich sehr aufgeschmissen gewesen.

Dr. Udo Hetzel hat mich in die Geheimnisse der Rasterelektronenmikroskopie eingeweiht. Seine Ideen und seine Kreativität waren unersetzlich für mich.

Dr. Kernt Köhler hatte stets ein offenes Ohr für alle meine Fragen und Problemchen. Vor allem zum Zustandekommen der histologischen Auswertung hat er wesentlich beitragen. Ohne ihn hätte ich jetzt noch keinen fahrbaren Untersatz. Danke, Kernt!

Alle Mitdoktoranden haben mich unterstützt; sei es durch die Einführung in die Zellkultur oder durch Wiederholung der Pathohisto-Grundlagen oder durch die stets verlässliche Hilfe bei technisch-fachlichen Fragen oder einfach moralisch durch die schöne Atmosphäre am Institut.

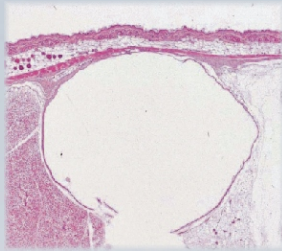
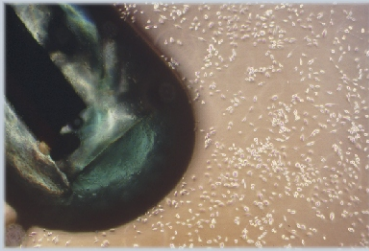
Ich danke euch allen, wobei mein spezieller Dank Kim Weber und Maike Huisinga gilt, mit denen ich spannende, diskussionsreiche Exkurse in die einfachen und schwierigen Fragen der Pathologie bestritten habe.

Ich hoffe, ich konnte ein wenig zur schönen Arbeitsatmosphäre am Institut beitragen.

Weiterhin danke ich allen Freunden und Freundinnen für ihre Unterstützung, auch wenn ich sie nicht alle namentlich erwähne.

Mein Dank gilt vor allem auch meinen Eltern. Sie haben mich jederzeit unterstützt und waren stets gute Zuhörer. Danke für Euer Vertrauen in mich.

Alex, ich danke auch dir. Du hast die meiste Zeit während des Studiums und der Doktorarbeit mein Leben geprägt. Ohne dich wäre ich ein anderer Mensch.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5046-0

